



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Bioacessibilidade *in vitro* das biotoxinas marinhas ácido ocadaico, dinofisistoxina -2 e seus derivados em bivalves crus e cozinhados

Diana Filipa Pereira Manita

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira
Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso
Doutor Pedro José Conde Reis Costa

ORIENTADOR

Doutor Pedro José Conde Reis Costa

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando Manuel d'Almeida
Bernardo

2017

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Bioacessibilidade *in vitro* das biotoxinas marinhas ácido ocadaico,
dinofisistoxina -2 e seus derivados em bivalves crus e cozinhados

Diana Filipa Pereira Manita

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira
Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso
Doutor Pedro José Conde Reis Costa

ORIENTADOR

Doutor Pedro José Conde Reis Costa

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando Manuel d'Almeida
Bernardo

2017

LISBOA

Agradecimentos

Ao meu orientador, Doutor Pedro Reis Costa, agradeço a oportunidade e o entusiasmo de realizar este trabalho, a disponibilidade para esclarecer todas as minhas dúvidas e inquietações, a incessante partilha de conhecimentos, a sinceridade e as palavras de incentivo, a confiança que depositou em mim e a forma como me ensinou a encarar as adversidades.

Ao Dr. António Marques pela disponibilidade em desenvolver os ensaios da bioacessibilidade no Laboratório de Química e a todos os elementos do Laboratório de Biotoxinas Marinhas do IPMA, em especial à Catarina e ao Ricardo pela constante disponibilidade para responder a qualquer pedido de ajuda, pela partilha de conhecimentos e opiniões e pelo contributo direto para a realização de parte deste trabalho.

À minha amiga Inês pela amizade, pelo consolo, apoio e encorajamento, pela troca de conselhos e pela revisão deste trabalho.

Aos meus amigos e familiares que se viram pontualmente privados da minha presença para que me pudesse dedicar à concretização deste trabalho, o meu sentido agradecimento pelas palavras de incentivo.

Ao Rudolfo pelo incentivo e compreensão, por acreditar em mim, tal como sempre acreditei nele e por ser para mim um exemplo e motivo de orgulho.

Às pessoas mais importantes: os meus pais e irmã, pelo amor e carinho, pela paciência, por se preocuparem comigo, por me ensinarem o valor do esforço e do trabalho e sobretudo, por acreditarem em mim.

Resumo- Bioacessibilidade *in vitro* das biotoxinas marinhas ácido ocadaico, dinofisistoxina -2 e seus derivados em bivalves crus e cozinhados

As biotoxinas marinhas mais frequentes e abundantes em Portugal são as toxinas lipofílicas, nomeadamente as toxinas do grupo do ácido ocadaico (AO), que inclui as dinofisistoxinas (DTX1 e DTX2) e os seus derivados (DTX3), responsáveis pela intoxicação diarreica (DSP *diarrhetic shellfish poisoning*). A investigação da presença, variabilidade e transformação de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves é de elevada importância não só para os consumidores e produtores de moluscos bivalves, mas também para as entidades reguladoras em segurança alimentar.

Até à data, a quantidade de toxinas ingeridas nos alimentos tem sido considerada igual à quantidade de toxinas disponível para a absorção pelo corpo humano após o processo digestivo.

Neste estudo, avaliou-se através de um modelo de digestão *in vitro* estático, a fração de AO, DTX2 e das suas formas esterificadas (DTX3), libertada do alimento para os fluidos digestivos (bioacessibilidade) em amostras naturalmente contaminadas de mexilhão, berbigão, conquilha e lingueirão. As amostras de mexilhão e conquilha apresentam regularmente um perfil de toxinas composto por AO e DTX2 nas suas formas livres, enquanto que o berbigão e o lingueirão têm uma elevada capacidade de biotransformação, o que conduz a que o seu perfil de toxinas seja constituído maioritariamente por formas esterificadas (DTX3). Amostras colhidas na costa Portuguesa foram utilizadas para avaliar a bioacessibilidade destes compostos, quer na matriz crua, como após cozedura a vapor. A Bioacessibilidade do conteúdo total de toxinas variou entre as espécies analisadas. A maior percentagem de toxinas bioacessíveis foi encontrada no mexilhão ($86 \pm 4 \%$), seguido da conquilha ($74 \pm 10 \%$), do lingueirão ($71 \pm 10 \%$) e, por último, do berbigão ($59 \pm 10 \%$). As toxinas que não se libertaram da matriz alimentar foram detetadas na fração não-bioacessível, correspondente à fração excretada. Nas amostras de mexilhão e conquilha determinou-se mais AO na fração bioacessível do que o presente na matriz alimentar antes da digestão. Não podendo haver mais AO do que aquele que foi ingerido, e tendo sido observado paralelamente um valor muito reduzido de AO esterificado na fração bioacessível, sugere-se uma conversão dos compostos esterificados no composto parental durante o processo digestivo. A conversão no trato digestivo dos compostos menos tóxicos (DTX3) nos seus compostos parentais mais potentes, vem justificar os casos de intoxicação após o consumo de bivalves contendo um perfil de toxinas dominado por DTX3. No entanto, nas amostras de berbigão e lingueirão não foi observada a conversão das formas esterificadas de AO, sugerindo um perfil de formas esterificadas diferente do mexilhão e conquilha. O tratamento a vapor foi avaliado nas amostras de mexilhão e berbigão, tendo-se observado um aumento da concentração das toxinas lipofílicas, mas uma redução da bioacessibilidade dos compostos face às matrizes cruas, sendo de destacar que a bioacessibilidade estimada para as amostras de berbigão foi interior a 50%. Este estudo fornece novos dados relevantes que podem melhorar e levar a estudos de avaliação de risco em segurança alimentar mais precisos sobre estas toxinas. A avaliação de risco com base exclusivamente na ocorrência das toxinas DSP em moluscos bivalves pode conduzir a uma sobrestimação da exposição e levar a medidas regulamentares mais conservadoras do que tendo em conta a quantidade de toxinas que podem ser absorvidas pelos epitélios intestinais.

Palavras-chave: intoxicação diarreica por molusco; ácido ocadaico, dinofisistoxina- 2; esterificação; digestão humana; bioacessibilidade

Abstract- *In vitro* bioaccessibility of the marine biotoxins okadaic acid, dinophysistoxin-2 and their derivatives in raw and steamed shellfish

The most common and abundant biotoxins in Portugal are lipophilic toxins, including okadaic acid group (OA) toxins, which includes the dinophysistoxins (DTX1 and DTX2) and its derivatives (DTX3), responsible for the human food borne illness diarrhetic shellfish poisoning (DSP). Investigating the presence, variability and processing of marine biotoxins in bivalve molluscs is highly important not only for consumers and shellfish producers but also for governmental agencies with responsibilities on food safety.

To date, the amount of toxins ingested in the food has been considered equal to the amount of toxins available for uptake by the human body after the digestive process.

In this study, we evaluated through a static *in vitro* digestion model, the fraction of OA, DTX2 and DTX3 released from the food to the digestive fluids (bioaccessibility) in naturally contaminated mussels, donax clams, cockles, and razor clams. Bioaccessibility was assessed in both raw and steamed shellfish matrices. Higher bioaccessibility was estimated for mussels ($86 \pm 4 \%$), followed by donax clams ($74 \pm 10 \%$), razor clams ($71 \pm 10 \%$) and finally cockles ($59 \pm 10 \%$). The amount of toxins not released into the digestive juices were detected in the non-bioaccessible fraction. In mussels and donax clams higher levels of OA were determined in the digestive juices than in the food matrix. Parallel to higher amounts of OA in bioaccessible fraction was observed a reduction of its esterified forms (DTX3), suggesting that DTX3 are converted into the parental compounds during the digestion process. This gastrointestinal conversion of less potent toxins into their more toxic parental compounds can be pointed out as a reason for human food poisonings after ingestion of contaminated shellfish containing mostly DTX3, as was previously observed in Portugal. However, conversion of DTX3 into OA was not observed in cockles and razor clams, suggesting that the suite of esterified compounds in these species is different from mussels and donax clams. Steaming of shellfish matrices, simulating a cooking treatment, lead to an increase of toxins concentration but significantly reduced their bioaccessibility, which was particular evident for cockles having the release of toxins been estimated by this *in vitro* model to levels below 50%. This study provides relevant new data that can improve and lead to more accurate food safety risk assessment studies concerning these toxins. Risk assessment based solely on DSP toxins occurrence in seafood can conduct to an overestimation of the exposure and lead to regulatory measures more conservative than taking into account the amount of toxins that can be absorbed by the intestinal epithelia.

Keywords: Diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, dinophysistoxin-2, esterification, human digestion, bioaccessibility

Elementos Bibliográficos Resultantes da Dissertação

Os resultados apresentados nesta dissertação foram objetivo de comunicação oral na 17ª Conferência Internacional de Algas Nocivas no Brasil (*ICHA- The 17th International Conference on Harmful Algae Brazil 2016*) e foram também objetivo de submissão em coautoria da seguinte comunicação sob a forma de artigo:

Manita, D., Alves R., Braga, A., Fogaça F., Marques, A., Costa P. *In vitro* bioaccessibility of the marine biotoxins okadaic acid, dinophysistoxin-2 and their 7-O-acyl fatty acid ester derivatives in raw and steamed shellfish. Publicado na revista Food and Chemical Toxicology.

Índice Geral

Elementos Bibliográficos Resultantes da Dissertação.....	Erro! Indicador não definido.
Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice Geral	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	ix
1. Introdução	1
1.1 Os moluscos bivalves e a sua importância no setor das pescas	1
1.2 Segurança alimentar e consumo de moluscos bivalves	5
1.2.1 Programa de Monitorização e controlo das Áreas de Produção.....	5
1.2.2 Programa de monitorização de metais tóxicos.....	6
1.2.3 Programa de monitorização de fitoplâncton tóxico.....	7
1.2.4 Programa de monitorização das biotoxinas marinhas.....	7
1.3 Biotoxinas marinhas.....	8
1.3.1 DSP (<i>Diarrhetic Shellfish Poisoning</i> ou intoxicação diarreica por molusco)	11
1.3.1.1 Estrutura química e propriedades das toxinas do grupo AO	11
1.3.1.2 Métodos analíticos utilizados para determinação das biotoxinas marinhas	13
1.4 Bioacessibilidade <i>in vitro</i>.....	14
1.5 Objetivos.....	15
2. Material e métodos.....	16
2.1 Origem e captura dos bivalves	16
2.2 Preparação e tratamento das amostras	16
2.2.1 Simulação de tratamento culinário.....	17
2.3 Bioacessibilidade- simulação da digestão humana <i>in vitro</i>	17
2.3.1 Reagentes	17
2.3.2 Protocolo da digestão <i>in vitro</i>	19
2.3.3 Eficiência da digestão - determinação da proteína	20
2.4 Análise das biotoxinas marinhas	20
2.4.1 Reagentes	21
2.4.2 Extração das biotoxinas marinhas	21
2.4.2.1 Extração dos tecidos e <i>pellets</i>	21
2.4.2.2 Extração da fração bioacessível	22
2.4.3 Determinação das Biotoxinas por LC-MS/MS	22

2.5	Análise estatística dos resultados	23
3.	Resultados	24
3.1	Toxicidade das amostras de moluscos bivalves cruas	24
3.2	Bioacessibilidade das toxinas do grupo AO.....	25
3.4	Bioacessibilidade das toxinas do grupo AO após cozedura.....	28
4.	Discussão	30
5.	Conclusão	33
6.	Referências Bibliográficas	34

Índice de Figuras

Figura 1 – Produção mundial de moluscos bivalves entre os anos de 1950 e 2009.....	2
Figura 2 - <i>Mytilus galloprovincialis</i>	3
Figura 3 - <i>Cerastoderma edule</i>	4
Figura 4 - <i>Donax spp.</i>	4
Figura 5 - <i>Solen marginatus</i>	5
Figura 6 – Estruturas químicas do AO, DTX 1, 2 e 3.....	12
Figura 7 - Ilustração de um cromatograma de um padrão de AO e DTX2 (m/z 803>255 transição usada para quantificação e m/z 803>563 para confirmação), obtido por cromatografia líquida com deteção por espectrometria de massa triplo-quadrupolo(LC-MS/MS).....	14
Figura 8 - Representação esquemática do protocolo da digestão <i>in vitro</i>	19
Figura 9 - Bioacessibilidade (% média \pm DP) do conteúdo total de toxinas do grupo AO em amostras cruas de mexilhão (<i>Mytilus galloprovincialis</i>), berbigão (<i>Cerastoderma edule</i>), conculha (<i>Donax spp.</i>) e lingueirão (<i>Solen marginatus</i>) colhidos na costa portuguesa. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre a % de bioacessibilidade das diferentes espécies ($p < 0,05$).	25
Figura 10 - Bioacessibilidade (% média \pm DP) das toxinas livres e esterificadas em amostras cruas de a) mexilhão (<i>Mytilus galloprovincialis</i>), b) conculha (<i>Donax spp.</i>), c) berbigão (<i>Cerastoderma edule</i>), e d) lingueirão (<i>Solen marginatus</i>).	26
Figura 11 - Perfil de toxinas do grupo AO (% média \pm DP) em amostras cruas antes da digestão (AD) e na fração bioacessível (BIO) de a) mexilhão (<i>Mytilus galloprovincialis</i>), b) conculha (<i>Donax spp.</i>), c) berbigão (<i>Cerastoderma edule</i>) e d) lingueirão (<i>Solen marginatus</i>).	26
Figura 12 - Bioacessibilidade (% média \pm DP) do conteúdo total de toxinas do grupo AO em amostras cozinhadas de mexilhão (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) e berbigão (<i>Cerastoderma edule</i>) colhidos na costa portuguesa. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cru e cozinhado estão assinaladas com *	29

Índice de Tabelas

Tabela 1- Critérios microbiológicos para classificação das zonas de produção de moluscos bivalves vivos de acordo com o Regulamento (CE) N.º854 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004	6
Tabela 2- Limites propostos pela UE para os metais tóxicos nos moluscos bivalves indicados nos regulamentos (CE) N.ºs 1881/2006 de 19/12 e 629/2008 de 2/7.	6
Tabela 3 – Limite Regulamentar das várias biotoxinas marinhas (medidas no corpo inteiro ou em qualquer parte comestível separadamente), de acordo com os Regulamentos (CE) N.º 853/2004 de 29 de abril e Regulamento (UE) N.º 786/2013 de 16 de agosto.....	8
Tabela 4 – Características das biotoxinas mais comuns na Europa..	10
Tabela 5 – Composição dos sucos digestivos utilizados no protocolo de digestão <i>in vitro</i> . Os volumes (mL) e massas (mg) foram calculados para um volume de 100 mL de cada solução.	18
Tabela 6- Ácido ocadaico (AO), Dinofisistoxina-2 (DTX2) e respetivas formas esterificadas em amostras de mexilhão (<i>Mytilus galloprovincialis</i>), berbigão (<i>Cerastoderma edule</i>), conculha (<i>Donax spp.</i>) e lingueirão (<i>Solen marginatus</i>) apanhados na costa portuguesa... ..	24
Tabela 7- Ácido ocadaico (AO), Dinofisistoxina- 2 (DTX2) e os seus ésteres derivados em amostras de mexilhão (<i>Mytilus galloprovincialis</i>), berbigão (<i>Cerastoderma edule</i>) sujeitas a tratamento térmico.	28

Lista de Abreviaturas

°C	graus <i>Celsius</i>
µg	micrograma(s)
µL	microlitro (s)
µm	micrómetro (s)
AD	Ácido domoico
AO	Ácido ocadaico
APCI	do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i>
ASP	intoxicação amnésica por molusco, do inglês <i>Amnesic Shellfish Poisoning</i>
AZA	Azaspirácidos
DL ⁵⁰	Dose letal 50
DP	Desvio padrão
DSP	Intoxicação diarreica por molusco, do inglês <i>Diarrhetic shellfish poisoning</i>
DTX1	Dinofisistoxina-1
DTX2	Dinofisistoxina-2
DTX3	Dinofisistoxina-3
E.U.A.	Estados Unidos da América
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético, do inglês <i>Ethylene Diamine Tetracetic Acid</i>
EFSA	do inglês <i>European Food Safety Authority</i>
ESI	do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
<i>et al.</i>	locução latina <i>et alli</i> , indicando que a obra a que se faz referência tem mais do que um autor, mencionando-se apenas o primeiro
FAO	do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>
g	grama (s)
<i>g</i>	unidade de campo gravitacional, utilizada como unidade de força centrífuga relativa
g/L	gramas por litro
HAB	do inglês <i>Harmful Algal Blooms</i>
HPLC	do inglês <i>High-performance liquid chromatography</i>
IPMA	Instituto Português do Mar e da Atmosfera
kg	quilograma (s)
LBM	Laboratório de biotoxinas marinhas
LC-MS/MS	do inglês <i>Liquid chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>

M	molar
m/v	massa por volume
MBA	do inglês <i>mouse bioassay</i>
mg	miligrama (s)
mL	mililitro (s)
mM	milimolar
MRM	do inglês <i>Multiple reaction monitoring</i>
NSP	Intoxicação neurotóxica por molusco, do inglês <i>Neurotoxic Shellfish Poisoning</i>
palOA	padrão não comercial do éster 7- 0 - acil com ácido palmítico
pH	simétrico do algoritmo decimal da concentração hidrogeniônica de uma solução
PP1	Proteína fosfatase 1, do inglês <i>Protein phosphatase 1</i>
PP2	Proteína fosfatase 2, do inglês <i>Protein phosphatase 2</i>
PSP	Intoxicação paralisante por molusco, do inglês <i>Paralytic Shellfish Poisoning</i>
PTX	Pectenotoxinas
STX	Saxitoxina
TEFs	Fatores de toxicidade equivalente, do inglês <i>Toxic Equivalence Factors</i>
UE	União Europeia
UK	do inglês <i>United Kingdom</i>
YTX	lessotoxinas
ZPB's	Zona de produção de bivalves

1. Introdução

Intoxicações humanas causadas por biotoxinas marinhas são habitualmente atribuídas à contaminação de moluscos bivalves com toxinas produzidas por algumas microalgas (a maioria dinoflagelados), componentes esporádicos da sua alimentação em certos períodos do ano (Vale, 2004). Na Europa são bem conhecidas há várias décadas as síndromes “intoxicação paralisante por molusco” (PSP) e a “intoxicação diarreica por molusco” (DSP). Ambas continuam nos dias de hoje a ser as principais biotoxinas causadoras de extensa contaminação (quer em concentração quer em duração temporal) nos bivalves da costa continental portuguesa (Vale, Botelho, Rodrigues, Gomes & Sampayo, 2008). Este fenómeno sucede também noutras costas europeias, causando grandes prejuízos económicos a todos os envolvidos na produção, transformação e comercialização de bivalves.

A DSP é causada pela ingestão de moluscos bivalves contaminados com ácido ocadaico (AO) e seus derivados. Com o objetivo de proteger os consumidores e minimizar os riscos de intoxicações agudas, os moluscos bivalves não podem ser capturados e comercializados nos países pertencentes à União Europeia quando os níveis de toxinas do grupo AO excede 160 µg equivalentes de AO por kg de molusco (Regulamento (CE) N° 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril, 2004).

1.1 Os moluscos bivalves e a sua importância no setor das pescas

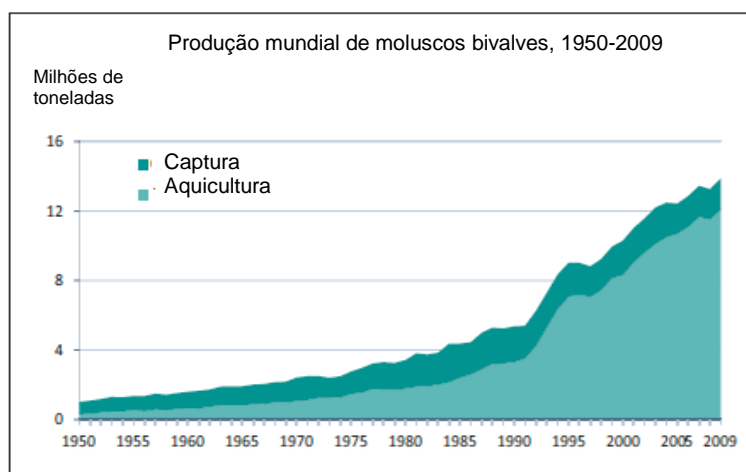
Os bivalves pertencem à classe *Bivalvia*, uma das seis classes do filo *Mollusca*, que compreende animais de corpo mole protegido por um exoesqueleto com forma de uma concha de duas válvulas (Gosling, 2004; IPIMAR, 2008). Embora a classe inclua um número relativamente pequeno de espécies, 7500, é uma classe com particular interesse, principalmente porque muitas das espécies são um importante recurso do setor da pesca (Gosling, 2004).

Em 2011, a nível mundial, a quantidade de produtos da pesca obtidos por apanha e cultura foi de 155,7 milhões de toneladas (FAO, 2014). Com o crescimento sustentado da produção de produtos da pesca e o desenvolvimento dos canais de distribuição, o abastecimento mundial destes produtos tem vindo a crescer consideravelmente nas últimas cinco décadas, com uma taxa anual de 3,2%, ultrapassando o crescimento da população mundial (1,6%). O consumo mundial de produtos da pesca *per capita* aumentou de uma média de 9,9 kg em 1960 para 18,9 kg em 2010 (FAO, 2014).

A produção de moluscos bivalves (captura + aquicultura) também tem crescido substancialmente nos últimos 50 anos, aumentando de aproximadamente 1 milhão de toneladas em 1950 para cerca 14 milhões de toneladas em 2007 (Figura 1) (Lawrence et al., 2011).

O crescimento da produção de moluscos bivalves é maioritariamente devido ao aumento da produção em aquicultura, que cresceu de 3,3 milhões de toneladas em 1990 para aproximadamente 12 milhões de toneladas em 2007. No ano de 2007, cerca de 85,7% da produção total de bivalves a nível mundial (12 milhões de toneladas) foi produzida em cultura.

Figura 1– Produção mundial de moluscos bivalves entre os anos de 1950 e 2009. *Adaptado de Lawrence et al., 2011*



O consumo de moluscos bivalves tem grande relevância e tradição na gastronomia portuguesa. Constituem um importante recurso na indústria da pesca nacional quer pela produção quer pelo número de pessoas que dependem da apanha e comercialização. Adicionalmente, prestam-se a inúmeras preparações culinárias, algumas bem enraizadas na gastronomia nacional (IPIMAR, 2008).

Em Portugal, são comercializadas pelo menos 16 espécies diferentes de bivalves, provenientes de várias zonas de produção: amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*), amêijoia-branca (*Spisula solida*), amêijoia-cão (*Venerupis aureus*), amêijoia-macha (*Venerupis pullastra*), amêijoia-vermelha (*Venerupis rhomboides*), ameijola (*Callista chione*), berbigão (*Cerastoderma edule*), conquilha (*Donax* spp.), lambujinha (*Scrobicularia chione*), longueirão ou lingueirão (*Ensis* spp.), mexilhão (*Mytilus* spp.), navalha (*Pharus legumen*), ostra (*Crassostrea* spp.), ostra plana (*Ostrea edulis*), pé-de-burrinho (*Venus striatula*) e pé-de-

burro (*Venus verrucosa*) (IPIMAR, 2008). De seguida apresenta-se uma breve descrição das principais espécies comercializadas:

Mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*)

A nível morfológico, a espécie *Mytilus galloprovincialis* (Figura 2) é caracterizada por uma concha lisa e sólida, equivalve e inequilateral, cilindroide aproximadamente triangular com dimensões de 30 a 140 mm (IPIMAR, 2008). É nativa da costa do mar Mediterrâneo e do mar Negro e Adriático (*Global Invasive Species Database*, 2016) . É muito comum e abundante em todo o litoral atlântico e em águas estuarinas. Pode ser cultivada em grande escala fixada a estacas enterradas no solo ou em cabos suspensos em jangadas e pode também ser capturada na zona intertidal com faca de mariscar. É comercializada em fresco, congelada e em conserva (IPIMAR, 2008).

Figura 2- *Mytilus galloprovincialis* (Fisheries and Aquaculture Department, 2016)



Berbigão (*Cerastoderma edule*)

Relativamente à sua morfologia, é caracterizada por uma concha sólida e arredondada coberta por pequenas estrias intervaladas entre si, equivalve e inequilateral. A sua dimensão média é 30-50 mm (IPIMAR, 2008).

Vive em fundos de areia, lama e cascalho, a apenas alguns metros de profundidade. Os habitats preferidos são baías de areia, com um pouco de chegada de água doce. A densidade das populações pode ser extremamente elevada (*Fisheries and Aquaculture Department*, 2016). Distribui-se da costa atlântica ao Senegal e costa mediterrânica (IPIMAR, 2008).

Figura 3- *Cerastoderma edule* (Fisheries and Aquaculture Department, 2016)



Conquilha (*Donax spp.*)

Esta espécie possui uma concha achatada lisa e brilhante, alongada e um pouco triangular. Cor branca e violeta. Encontra-se nos primeiros metros da região infralitoral de fundos arenosos, ao nível inferior das marés. Distribui-se pelo Litoral europeu atlântico, Atlântico este e Mediterrâneo. A nível nacional distribui-se por toda a costa continental, especialmente a sul do país (IPIMAR, 2008).

Figura 4- *Donax spp.* (Encyclopedia of Life, 2012b)



Lingueirão (*Solen marginatus*)

Possui uma concha fina e frágil, retangular muito alongada, com as extremidades truncadas quase verticalmente abertas. A sua dimensão média é entre 155 a 220 mm. Vive enterrado em fundos de areia nos estuários e rias. Distribui-se pelo Atlântico Nordeste e Mediterrâneo. Em Portugal existe em maior quantidade no litoral algarvio até ao rio Sado (IPIMAR, 2008).

Figura 5- *Solen marginatus* (Encyclopedia of Life, 2012)



1.2 Segurança alimentar e consumo de moluscos bivalves

Os moluscos bivalves são capazes de filtrar grandes volumes de água para obter nutrientes e oxigénio. Em consequência, podem acumular no seu interior diversos agentes nocivos como contaminantes químicos e biológicos, suscetíveis de causarem diversas doenças ao consumidor. Este facto exige que estes organismos destinados à alimentação humana respeitem exigências e normas sanitárias desde a produção à sua distribuição, de modo a garantir a sua salubridade (IPIMAR, 2008).

A regulamentação europeia para a produção e comercialização de moluscos bivalves impõe um conjunto de procedimentos de monitorização e controlo que são da responsabilidade do Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P. (IPMA).

De acordo com Decreto-Lei 68/2012, de 20 de Março do Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território, o IPMA, I.P. é a entidade responsável pelo controlo de qualidade das zonas de produção de moluscos bivalves que tem como base um programa de monitorização no qual se determina a qualidade das zonas estuarinas, lagunares e litorais. Esta monitorização tem como foco a determinação de quatro parâmetros: i) quantificação das bactérias de origem fecal no músculo e líquido intervalvar dos animais; ii) teores de metais tóxicos nos bivalves, iii) níveis de biotoxinas marinhas nos bivalves; e iv) presença de fitoplâncton tóxico.

1.2.1 Programa de Monitorização e controlo das Áreas de Produção

As zonas de produção de bivalves (ZPB's) podem ser significativamente afetadas pelas fontes de contaminação existentes. Os bivalves, como organismos filtradores, concentram um maior número de microrganismos do que o meio onde se desenvolvem, sendo por isso extremamente importante o seu controlo higio-sanitário. Este controlo baseia-se essencialmente na quantificação do teor de bactérias indicadoras da contaminação fecal (Soares, Almeida, & Cachola, 2012).

A monitorização microbiológica das ZPB's envolve a sua classificação em categorias ou estatuto sanitário, de acordo com os teores bacteriológicos encontrados (Tabela 1). Atualmente e desde 2005, esta classificação baseia-se no teor de *Escherichia coli*.

Estes sistemas de classificação permitem avaliar o grau de contaminação fecal existente nas diferentes zonas de produção de bivalves e determinar qual o tipo de tratamento a que os bivalves têm de ser submetidos para poderem ser comercializados (Cachola & Campos, 2006).

Tabela 1 - Critérios microbiológicos para classificação das zonas de produção de moluscos bivalves vivos de acordo com o Regulamento (CE) N°854 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004

Classes	Níveis permitidos (Teor de E.coli/100g)	Resultados
A	≤ 230 E. coli/100g de carne e líquido intervalvar	Centro de Expedição e Consumo Direto
B	$230 < \text{E. coli} \leq 4600$ /100g de carne e líquido intervalvar em 90% das amostras	Depuração e depois cumprir os requisitos da Classe A
C	$4600 < \text{E. coli} \leq 46000$ /100g de carne e líquido intervalvar	Indústria transformadora ou permanecer pelo menos 2 meses em zona de transposição
Proibida	> 46000 E. coli/100g de carne e líquido intervalvar	Proibida a apanha

1.2.2 Programa de monitorização de metais tóxicos

São considerados metais tóxicos os elementos cuja acumulação pode provocar efeitos graves ao nível neurológico, pulmonar, cardiovascular, hematológico, renal, ósseo e morfológico dos organismos vivos. São também considerados cancerígenos, podendo inclusive levar à morte em casos extremos. De entre estes, destacam-se o mercúrio, o chumbo e o cádmio. Devido à sua morfologia e ao seu habitat natural, os moluscos bivalves podem acumular no seu organismo estes metais, principalmente chumbo e cádmio. Desde 2001 que a União Europeia (UE) propõe limites para estes três elementos em vários produtos alimentares, incluindo os moluscos bivalves (tabela 2). Estes metais são analisados por espectrofotometria de absorção atómica.

Tabela 2- Limites propostos pela UE para os metais tóxicos nos moluscos bivalves indicados nos regulamentos (CE) N.ºs 1881/2006 de 19/12 e 629/2008 de 2/7.

1.2.3 Programa de fitoplâncton

Elemento	Teor máximo admissível (mg/kg) (parte edível)
Mercúrio	0,5
Chumbo	1,5
Cádmio	1,0

monitorização de tóxico

Desde 1985 que são desenvolvidos estudos sobre a ecologia de microalgas tóxicas marinhas, os quais conduziram à elaboração de um programa nacional de monitorização de algas tóxicas ao longo da costa, para apoio à previsão e ao controlo da toxicidade em moluscos bivalves.

A legislação que regula a concentração máxima de toxinas presentes em bivalves refere também a necessidade de controlar a presença de microalgas tóxicas nas águas e em zonas de reprodução e transposição de bivalves. Apesar de ser mencionado este controlo, o Regulamento (CE) N.º 854/2004 de 29 de Abril do Parlamento Europeu e do Conselho, 2004 não refere uma concentração limite de células fitoplanctónicas na água do mar, embora permita a interdição da apanha sempre que ocorra um desenvolvimento significativo de espécies tóxicas (IPIMAR, 2008).

1.2.4 Programa de monitorização das biotoxinas marinhas

Para prevenção da saúde pública foi dado início, em 1986, ao Programa de Monitorização de Biotoxinas Marinhas (Burri & Vale, 2006).

A amostragem de moluscos bivalves vivos para monitorização de biotoxinas é realizada com base nas zonas de produção costeiras e zonas estuarino-lagunares definidas no Despacho N.º 15264/2013 de 22 de novembro de 2013. Esta deve ser efetuada para a(s) espécie(s) indicadoras(s) de contaminação por biotoxinas da respetiva zona de produção. Quando se detetar a presença de biotoxinas na espécie indicadora, ou se detetar a presença de espécies fitoplânctónicas potencialmente tóxicas, a amostragem é intensificada para as restantes espécies de bivalves existentes nessa mesma zona (IPMA, 2015).

Os bivalves são analisados semanalmente no Laboratório Nacional de Referência de Biotoxinas Marinhas (LBM) para pesquisa das toxinas lipofílicas, sendo as toxinas mais comuns as toxinas do grupo do AO, responsáveis por intoxicações diarreicas e designadas por DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning* ou intoxicação diarreica por molusco). As toxinas hidrofílicas do grupo da saxitoxina (STX), responsáveis pela intoxicação paralisante PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning* ou intoxicação paralisante por molusco) e as toxinas do grupo

do ácido domoico (AD), responsáveis por intoxicações amnésicas ASP (*Amnesic Shellfish Poisoning* ou intoxicação amnésica por molusco) são outros dois grupos de biotoxinas monitorizadas. Outras toxinas como iessotoxinas (YTX), pectenotoxinas (PTX) e azaspirácidos (AZA) são também regularmente analisadas nos bivalves, não tendo sido detetadas, ou apenas detetadas em quantidades vestigiais (IPIMAR, 2008).

Os valores-limite para as biotoxinas marinhas DSP, PSP, ASP, YTX, PTX e AZA estão fixados pelos Regulamentos (CE) N.º 853/2004 de 29 de abril e Regulamento (UE) N.º 786/2013 de 16 de agosto e estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Limite regulamentar das várias biotoxinas marinhas (medidas no corpo inteiro ou em qualquer parte comestível separadamente), de acordo com os Regulamentos (CE) N.º 853/2004 de 29 de abril e Regulamento (UE) N.º 786/2013 de 16 de agosto.

Grupo de Toxina	Limite máximo regulamentado
Ácido ocadaico, dinofisistoxinas, PTX	160 µg AO equiv./kg
PSP (<i>Paralytic Shellfish Poison</i>)	800 µg STX equiv./kg
ASP (<i>Amnesic Shellfish Poison</i>)	20 mg AD/kg
Iessotoxinas	3,75 mg YTX equiv./kg
Azaspirácidos	160 µg AZA equiv./kg

Quando os níveis de biotoxinas são detetados acima do Limite Regulamentar (Tabela 3), o IPMA, I.P., desencadeia a “interdição da apanha e comercialização” dos bivalves afetados. De acordo com o Ponto 6 do Regulamento N.º 854/2004 “sempre que os teores de toxinas da espécie indicadora [definida para cada zona de produção, como aquela que mais rapidamente responde às variações de condições ambientais] se situem acima dos valores-limite regulamentares” a apanha “das demais espécies só será permitida se outras análises efetuadas sobre estas mesmas espécies revelarem teores de toxinas abaixo dos valores-limite”. O IPMA, I.P. só determina a reabertura de uma zona de produção encerrada após dois resultados de biotoxinas consecutivos abaixo do valor-limite regulamentar separados pelo menos por 48 horas. A interdição, reabertura ou reclassificação de uma zona de produção ocorre por Decisão do Conselho Diretivo, e é divulgada na página do instituto www.ipma.pt e por correio eletrónico/telefax a todos os utilizadores registados.

1.3 Biotoxinas marinhas

As biotoxinas marinhas são metabolitos naturais produzidos por microalgas unicelulares (protistas). A maior parte das biotoxinas marinhas são produzidas por dinoflagelados. Através da acumulação ao longo da cadeia alimentar, estas toxinas podem-se concentrar numa enorme variedade de organismos marinhos, incluindo os moluscos bivalves. Deste

modo, as toxinas são acumuladas ativamente pelos organismos marinhos e concentram-se no hepatopâncreas dos bivalves, o seu órgão digestivo. Os fatores que influenciam esta acumulação são estudados intensivamente (Lawrence *et al.*, 2011). Embora algumas toxinas sejam acumuladas regularmente em determinadas áreas por espécies particulares de bivalves, em geral a previsão dos níveis de contaminação continua a ser um grande desafio devido a inúmeros de fatores: (1) fatores relacionados com as algas, como parâmetros físicos (temperatura, vento, condições de luz), químicos (disponibilidade de oxigénio, poluição antropogénica) e biológicos (evolução da estrutura da comunidade de algas), (2) fatores relacionados com os organismos marinhos, como as condições de cultura, filtração (taxas de filtração específicas de cada espécie e seletividade) e metabolismo (diferenças entre espécies, alterações metabólicas em bivalves resultantes da variação sazonal, estado de reprodução) (Lawrence *et al.*, 2011).

A elevada concentração de determinadas células de fitoplâncton, designada por *bloom*, pode causar diversos efeitos que são percebidos pelo homem como nocivos, sendo por isso designadas internacionalmente por HAB (*Harmful Algal Blooms*, ou “proliferações de algas nocivas”). Estes *blooms* prejudiciais podem diferenciar-se em vários tipos, dependendo das espécies fitoplanctónicas envolvidas: i) espécies produtoras de toxinas, que podem ser introduzidas na cadeia alimentar provocando desordens gastrointestinais, neurológicas e amnésicas; ii) espécies não tóxicas que originam grandes concentrações de matéria orgânica, podendo provocar alteração da cor da água do mar ocasionando condições de anoxia que origina a morte de peixes e invertebrados; iii) espécies não tóxicas mas prejudiciais para os invertebrados e peixes, que provocam alterações na estrutura anatómica da sua parede celular e nos tecidos delicados das brânquias (IPIMAR, 2008).

Na costa portuguesa, os *blooms* de dinoflagelados como *Dinophysis*, tais como *D.acuta* e *D.acuminata*, responsáveis por intoxicações do tipo diarreico (DSP) são bastante comuns, conduzindo todos os anos à interdição da apanha e comercialização de bivalves, por vezes durante vários meses (Moita, Palma, & Vilarinho, 2005).

Os métodos utilizados para a deteção de biotoxinas marinhas têm sido historicamente influenciados pela falta de conhecimento dos agentes causadores específicos. Sem o conhecimento exato de todas as entidades químicas e toxicologicamente relevantes, é difícil desenvolver e validar métodos específicos de análise quantitativa. Nas fases iniciais de desenvolvimento dos testes, ainda não era claro se a doença era causada por químicos ou agentes microbiológicos. Devido a esta falta de conhecimento sobre os agentes causadores, as classificações iniciais de intoxicação por moluscos eram baseadas nos sintomas experienciados pelo homem após o consumo de organismos marinhos contaminados (Lawrence *et al.*, 2011). Quatro categorias são identificadas:

- (1) intoxicação diarreica por molusco (DSP *diarrhetic shellfish poisoning*) – causada pelo ácido ocadaico (AO);

- (2) intoxicação paralisante por molusco (PSP *paralytic shellfish poisoning*) – causada por STX;
- (3) intoxicação amnésica por molusco (ASP *amnesic shellfish poisoning*) – causada pelo ácido domóico (AD);
- (4) intoxicação neurotóxica por molusco (NSP *neurotoxic shellfish poisoning*) – causada por brevetoxinas.

Mais recentemente descobriu-se a intoxicação por azaspirácidos (AZA *azaspiracid poisoning*), e os seus sintomas assemelham-se aos da DSP (FAO, 2004a).

Do ponto de vista médico, é agora mais evidente a distinção entre estes sintomas por intoxicação, dos sintomas causados por bactérias ou vírus, pelo seu início precoce. A maioria das infeções bacterianas e virais são caracterizadas por períodos de incubação de 12- 24h antes da doença se evidenciar, enquanto a intoxicação por biotoxinas marinhas normalmente ocorre 30 minutos após o consumo (tabela 4) (Lawrence et al., 2011).

Tabela 4 – Características das biotoxinas mais comuns na Europa. Adaptado de (FAO, 2004 e Vasconcelos, 2013).

	Toxinas	Sintomas	Origem
DSP	Ácido ocadaico, Dinofisistoxinas	Entre 30 minutos a 1 hora Diarreia, vômitos, dor abdominal	<i>Dinophysis acuta</i> , <i>D. acuminata</i>
PSP	Grupo de alcaloides (saxitoxinas e derivados)	2 a 5 horas Desordem neurológica (zumbidos, tremores, discurso incoerente). Dificuldade respiratória	<i>Alexandrium catenella</i> , <i>A. minutum</i> , <i>A. mamarense</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i>
ASP	Ácido domóico	Dentro de 12 horas: vômitos, náuseas, diarreia, cólicas abdominais. Até 48 h, vertigens, alucinações, confusão, perda de memória temporária, Casos mais graves: lesões cerebrais, coma e morte	<i>Pseudonitzschia pseudodelicatissima</i> , <i>P. australis</i>
AZA	Azaspirácidos	Dores abdominais, diarreia e vômitos	<i>Azidinium spinosum</i>

1.3.2 DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning* ou intoxicação diarreica por molusco)

A DSP é uma doença gastrointestinal devida à ingestão de moluscos contaminados com biotoxinas marinhas do grupo do ácido ocadaico (AO), que inclui os seus isómeros dinofisistoxina 1 e dinofisistoxina 2 (DTX1 e DTX2) (Vale & Sampayo, 2002b). Estas são as toxinas mais abundantes e mais frequentemente encontradas nas áreas costeiras do sul da Europa (Braga *et al.*, 2016). No Japão foi relatado que o aparecimento de uma intoxicação alimentar resultante do consumo de vieiras contaminadas foi devido à ocorrência de ésteres das toxinas parentais (AO, DTX1 e DTX2) denominados DTX3 (Yasumoto *et al.*, 1985). Posteriormente, estes dados foram confirmados num estudo realizado por Vale & Sampayo, (1999) em que concluíram que os compostos responsáveis pelo surto de DSP na costa sul de Portugal em 1998, foram formas esterificadas de AO coletivamente designados por DTX3.

A DSP apresenta um quadro gastrointestinal que inclui diarreia, vômitos, dores abdominais, fraqueza muscular e cefaleias, com a duração de entre um a três dias. As análises dos perfis de toxinas demonstraram que duas toxinas contaminam regularmente os bivalves em Portugal, o AO e a DTX2. As toxinas do grupo AO são geralmente produzidas por dinoflagelados que pertencem ao género *Dinophysis spp.*, contudo o género *Prorocentrum* também parece ser um produtor de toxinas DSP (European Food Safety Authority, 2008). O AO é frequentemente detetado em Portugal, desde a primavera até ao final do outono, associado aos *blooms* de *D.acuminata*. A DTX2 normalmente ocorre no final do verão quando *blooms* de *D.acuta* são observados (Moita *et al.*, 2016). As toxinas do grupo AO são potentes inibidoras das proteínas fosfatases específicas para a desfosforilação de serina e treonina (PP1 E PP2A), provocando alterações em diversos processos intracelulares e causando danos severos na mucosa do intestino (Matias, Traore, & Creppy, 1999). Adicionalmente, o AO foi considerado como potente promotor tumoral (Suganuma *et al.*, 1988).

1.3.2.1 Estrutura química e propriedades das toxinas do grupo AO

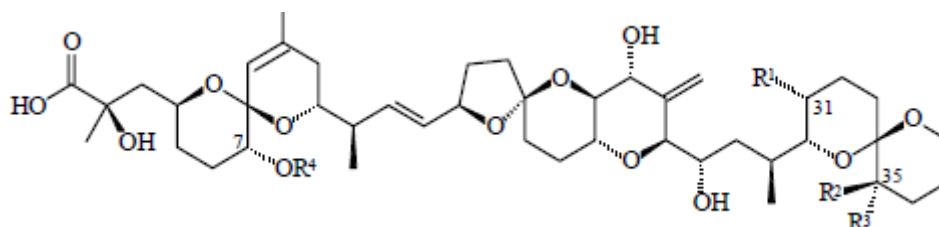
O ácido ocadaico juntamente com as dinofisistoxinas (DTX1, DTX2 e DTX3) são toxinas lipofílicas termoestáveis, produzidas por dinoflagelados e podem ser encontradas em diferentes espécies de moluscos bivalves. Enquanto o AO e a DTX2 só diferem pela posição de um grupo metilo na molécula, a DTX1 tem um grupo metilo adicional e a DTX3 representa uma enorme variedade de derivados do AO, DTX1 e DTX2 esterificados com ácidos gordos saturados e insaturados (figura 6) (EFSA,2008). A DTX3 também possui atividade tóxica mas mais reduzida do que os respetivos compostos parentais (Rodrigues & Vale, 2009). Uma vez que estas formas esterificadas ainda só foram detetadas nas

glândulas digestivas de moluscos bivalves contaminados, presume-se que sejam produtos metabólicos e não novos produtos produzidos pelas microalgas marinhas (EFSA,2008).

Foi demonstrado que cerca de 98-99 % do AO e DTX2 são frequentemente encontrados na sua forma esterificada em ameijoas, lingueirão, berbigão e ostras. No entanto no mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*) e na conchilha (*Donax spp.*), o AO e DTX2 são usualmente encontrados quer na forma esterificada quer na forma livre, com percentagens variáveis de ésteres (Vale & Sampayo, 1999, Vale & Sampayo, 2002b, Vale, 2006). A deteção direta dos ésteres através do LC-MS/MS é dificultada pela falta de padrões comerciais e pela enorme variedade de ésteres que podem estar presentes nas amostras de bivalves (Rodrigues & Vale, 2009). A reação de hidrólise alcalina com hidróxido de sódio (NaOH) liberta os ácidos gordos da toxina parental e dá uma estimativa indireta da sua abundância (Yanagi, Murata, Torigoe, & Yasumoto, 1989).

O teor de toxinas é expresso como a soma de AO equivalentes. Com base em experiências de dose letal (DL50)¹, após injeção intraperitoneal em ratinhos, estabeleceram-se os seguintes fatores de toxicidade equivalente (TEFs, *toxic equivalence factors*): AO = 1, DTX1 = 1, DTX2 = 0,6. Relativamente à DTX3, aplica-se o TEF igual ao da toxina não esterificada correspondente (AO, DTX1 e DTX2) (EFSA, 2008).

Figura 6 – Estruturas químicas do AO, DTX 1, 2 e 3 (EFSA, 2008).



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
OA	CH ₃	H	H	H
DTX1	CH ₃	CH ₃	H	H
DTX2	H	H	CH ₃	H
DTX3	H/CH ₃	H/CH ₃	H/CH ₃	ácido gordo

¹ Dose única, calculada estatisticamente, de uma substância suscetível de causar a morte de 50% dos animais quando administrada por via oral. O valor da DL50 é expresso em peso, de substância de ensaio, por unidade de peso do animal de ensaio (mg/kg).

1.3.2.2 Métodos analíticos utilizados para determinação das biotoxinas marinhas

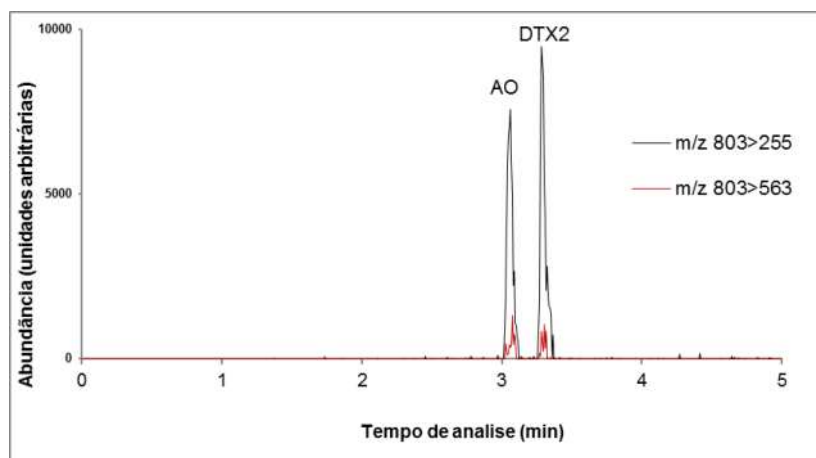
O Regulamento (UE) N.º 15/2011, que altera o Regulamento (CE) N.º 2074/2005, no domínio dos métodos de teste reconhecidos para deteção de biotoxinas marinhas nos moluscos bivalves vivos, estabelece um método de cromatografia líquida associado à espectrometria de massa (LC-MS/MS) como método de referência europeu para a deteção de toxinas lipofílicas em bivalves e este deve ser utilizado, por rotina, para efeitos de controlos oficiais em qualquer fase da cadeia alimentar.

O bioensaio em ratinhos (MBA) eram os métodos oficiais para deteção de toxinas lipofílicas. O Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA), referiu que estes bioensaios apresentavam lacunas e não eram considerados um instrumento adequado para efeitos de controlo devido à elevada variabilidade dos resultados, à insuficiente capacidade de deteção e à especificidade limitada (Regulamento (UE) N.º 15/2011 de 10 de Janeiro, 2011). Desenvolveram-se métodos alternativos aos métodos biológicos e, através de uma validação interlaboratorial entre os estados membros, validou-se a LC-MS/MS.

Princípios gerais de LC-MS/MS

O LC-MS/MS é uma técnica que combina a capacidade de separação do HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) com o poder de deteção do espectrómetro de massa. É necessária uma interface que elimina o solvente e gera iões em fase gasosa, sendo estes depois transferidos para o sistema do espectrómetro de massa. As interfaces de ionização mais utilizadas correspondem a fontes de ionização a pressão atmosférica por *electrospray* (ESI) e por ionização química (APCI). A ionização na interface ESI é considerada uma técnica de ionização em fase líquida, na qual os iões formados em solução são dessorvidos ou evaporados para a fase gasosa e podem consequentemente ser analisados por espectrometria de massa (Scripps Center for Metabolomics and Mass Spectrometry, 2014). A espectrometria de massa baseia-se na produção de iões que são separados e filtrados atendendo à sua relação massa carga (m/z) e detetados. O espectro de massa resultante corresponde a um gráfico que apresenta a abundância relativa de cada um dos iões formados em função da sua relação massa/carga (Pitt, 2009). A configuração utilizada na análise das biotoxinas lipofílicas resulta da conjugação de um sistema de cromatografia líquida com analisadores de triplo quadrupolo, os quais operam no modo monitorização em “*Multiple reaction monitoring*” (MRM) e recorrendo a interfaces de ESI (Fux, McMillan, Bire, & Hess, 2007). O resultado obtido é um cromatograma (Figura 7) em que no eixo das abcissas é apresentado o tempo de análise e no eixo das ordenadas a intensidade do sinal.

Figura 7- Ilustração de um cromatograma de um padrão de AO e DTX2 (m/z 803>255 transição usada para quantificação e m/z 803>563 para confirmação), obtido por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa triplo-quadrupolo(LC-MS/MS)



1.4 Bioacessibilidade *in vitro*

O número de estudos existente sobre o potencial toxicológico das toxinas do grupo AO é muito limitado. A maioria dos estudos sobre a distribuição e dinâmica destas toxinas foram baseados em injeções intraperitoniais de AO em ratinhos (Aune *et al.*, 2007) e um número reduzido sobre a exposição oral a estas toxinas. Ao serem expostos ao AO por via oral, apenas 59% da toxina foi encontrada acumulada no trato gastrointestinal dos ratinhos (Matias *et al.*, 1999). Até ao presente, a quantidade de toxinas ingeridas através dos alimentos tem sido considerada igual à quantidade de toxinas disponível para absorção pelo corpo humano. No entanto, tem sido demonstrado através de várias metodologias tais como o estudo da bioacessibilidade, que existem diferenças entre a quantidade de nutriente/contaminante que é ingerida e a quantidade que se encontra disponível para ser absorvida pelas células do epitélio intestinal (Marques *et al.*, 2011). A bioacessibilidade é definida como a fração de um dado composto que é libertada do alimento para o fluido gastrointestinal após o processo digestivo, ficando disponível para absorção pela mucosa intestinal e entrada na circulação sistémica (Versantvoort *et al.*, 2005). Ou seja, apenas uma proporção desse composto (por exemplo, nutrientes, contaminantes químicos, toxinas) que é ingerido irá atingir a circulação sistémica podendo exercer o seu efeito tóxico. Fatores como a composição da matriz, composição iónica, atividade e concentrações das enzimas digestivas, pH, temperatura e tempo de incubação podem influenciar significativamente a libertação desse composto dos alimentos (Hur *et al.*, 2011; Versantvoort *et al.*, 2005). Existem dois tipos de abordagens analíticas principais para a determinação da bioacessibilidade: *in vitro* e *in vivo*. A abordagem *in vivo* é dispendiosa, demorada, exige um

planeamento minucioso, recursos específicos para um controlo experimental adequado e tem algumas limitações analíticas e éticas (Cardoso, Afonso, Lourenço, Costa, & Nunes, 2015). De modo a ultrapassar estas dificuldades, uma forma alternativa de realizar estes estudos é recorrer a metodologias *in vitro*, estas podem ser simples, rápidas e de custos moderados. Na abordagem *in vitro*, o processo digestivo é simulado de uma forma simplificada por aplicação/simulação de condições fisiológicas, isto é, composição química de fluidos digestivos, pH e períodos típicos de tempo de residência para cada compartimento (Versantvoort, Van de Kamp, & Rompelberg, 2004). Estas metodologias geralmente simulam as três principais fases da fisiologia gastrointestinal: salivar, gástrica/estomacal e intestinal.

1.5 Objetivos

A presente dissertação tem como principal objetivo estudar a bioacessibilidade das biotoxinas marinhas AO e DTX2 em bivalves crus e cozinhados provenientes da costa Portuguesa. Para alcançar este objetivo, foi utilizado um método *in vitro* de digestão humana em 4 espécies de bivalves com importante valor comercial em Portugal, o mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*), o berbigão (*Cerastoderma edule*), a conculha (*Donax spp*) e lingueirão (*Solen marginatus*).

2. Material e métodos

2.1 Origem e captura dos bivalves

Neste estudo foram analisados bivalves naturalmente contaminados, capturados em algumas zonas de produção costeiras e zonas estuarino-lagunares definidas no Despacho n.º 15264/2013 de 22 de Novembro, 2013, entre os meses de julho e outubro de 2015. Os bivalves foram capturados em 9 pontos de colheita, localizados em diferentes capitâncias incluídas em cinco regiões principais: região norte com pontos de colheita no Douro (n = 1) e em Caminha (n = 1); região centro com pontos de colheita distribuídos por Aveiro (n = 4) e Figueira da Foz (n = 5); região Lisboa e Vale do Tejo com pontos de colheita distribuídos por Peniche (n = 1) e Lisboa (n = 3); região do Alentejo com ponto de colheita em Setúbal (n = 1); e região do Algarve cujos pontos de colheita se localizaram em Lagos (n = 1) e Olhão (n = 1).

Os bivalves foram capturados mediante o procedimento utilizado para a amostragem e transporte de moluscos bivalves do programa de monitorização de biotoxinas marinhas do Laboratório de Biotoxinas Marinhas (LBM) do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, I.P.). A amostragem dos moluscos bivalves foi efetuada tendo em atenção o tamanho mínimo legal de captura (Portaria n.º 27/2001, de 15 de Janeiro, 2001). As quantidades a amostrar para as várias espécies de bivalves em zonas estuarino-lagunares e zonas litorais são entre 1,5 e 2 kg, e no mínimo 30 indivíduos. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos de plástico, identificadas com o nome da espécie, local e data de colheita e zona de produção, e colocadas em caixas isotérmicas contendo termoacumuladores refrigerados até serem transportados para o LBM, onde foram, de imediato, processadas.

2.2 Preparação e tratamento das amostras

Nas instalações do LBM em Lisboa, os bivalves foram lavados com água corrente, de forma a remover quaisquer resíduos, como areia, e devidamente escorridos. As partes edíveis dos organismos foram retiradas da concha, em seguida homogeneizadas num liquidificador e armazenadas a -20 °C até serem utilizadas.

No total foram analisadas 18 amostras, distribuídas por 4 espécies: mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*), (n = 6), conchilha (*Donax spp*), (n = 3), berbigão (*Cerastoderma edule*), (n = 5) e lingueirão (*Solen marginatus*), (n = 4). Cada amostra era composta por pelo menos 30 elementos.

2.2.1 Simulação de tratamento culinário

As amostras de *M. galloprovincialis* e de *C. edule* previamente homogeneizadas, foram sujeitas a uma cozedura a vapor num forno (*Rational CombiMaster®*) durante 5 minutos a 100 °C. Foram utilizadas cerca de 15 g de cada amostra e em seguida ao tratamento culinário, as amostras foram homogeneizadas e conservadas a -20 °C até à realização dos ensaios da bioacessibilidade

2.3 Bioacessibilidade- simulação da digestão humana *in vitro*

A bioacessibilidade do ácido ocadaico e dinofisistoxinas nas amostras de bivalves foi realizada utilizando um modelo estático de digestão humana *in vitro*, de acordo com a metodologia descrita por Braga *et al.* (2016) e Versantvoort *et al.* (2005).

Resumidamente, o protocolo da digestão *in vitro* consistiu em três fases: oral, gástrica e intestinal utilizando quatro sucos digestivos: saliva, suco gástrico, suco duodenal e biliar. A composição dos sucos encontra-se descrita na tabela 5.

2.3.1 Reagentes

Os compostos orgânicos e inorgânicos utilizados para a preparação dos fluidos digestivos foram os seguintes: KCl (*Merck*, 99,5 % m/v), KSCN (*Sigma*, P2713), NaH₂PO₄ (*Merck*, 99,5 % m/v), Na₂SO₄ (*Merck*, 90 % m/v), NaCl (*Merck*, 99,5 % m/v), NaHCO₃ (*Merck*, 99,5 % m/v), CaCl₂.2H₂O (*Sigma*, C3881), (*Merck*, 99,5 % m/v), Na₂SO₄ (*Merck*, 90 % m/v), NaCl (*Merck*, 99,5 % m/v), NaHCO₃ (*Merck*, 99,5 % m/v), NH₄Cl (*Riedel-de Haën*, 99,5 % m/v), KH₂PO₄ (*Merck*, 99,5 % m/v), MgCl₂ (*Riedel-de Haën*, 99,5 % m/v), HCl (*Merck*, 37 % m/v), ureia (*Sigma*, U5128), glucose (*Sigma*, G5400), ácido glucorónico (*Sigma*, G5269), Hidrocloridrato de Glucosamina (*Sigma*, G4875), ácido úrico (*Sigma*, U2625), albumina de soro bovino (*Sigma*, A7906), α- amilase de *Aspergillus oryzae* (*Sigma*, 86250), mucina de estômago de porco (*Sigma*, P7125), lipase de pâncreas de porco, tipo II (*Sigma*, L3126), pancreatina de pâncreas de porco *Sigma* P8096), tripsina de pâncreas de porco (*Sigma*, T6567), α-quimotripsina de pâncreas de bovino (*Sigma* C4129), extrato de biliar de porco (*Sigma*, B863).

Tabela 5 – Composição dos sucos digestivos utilizados no protocolo de digestão *in vitro*. Os volumes (mL) e massas (mg) foram calculados para um volume de 100 mL de cada solução. *Adaptado de Braga et al. (2016)*

	Compostos (concentração stock)	Fase Oral Saliva	Fase gástrica Suco gástrico	Fase Intestinal	
		Volume (mL)	Volume (mL)	Suco Duodenal Volume (mL)	Bilis Volume (mL)
Compostos orgânicos e inorgânicos	KCl (89,6 g/L)	2,0	1,8	1,2	0,8
	KSCN (20 g/L)	2,0	-	-	-
	NaH ₂ PO ₄ (88,8 g/L)	2,0	0,6	-	-
	Na ₂ SO ₄ (57 g/L)	2,0	-	-	-
	NaCl (175,3 g/L)	0,4	3,1	8,0	6,0
	NaHCO ₃ (84,7 g/L)	4,0	-	1,33*	13,6
	CaCl ₂ .2H ₂ O (22,2 g/L)	-	3,6	0,144*	0,080*
	NH ₄ Cl (30,6 g/L)	-	2,0	-	-
	KH ₂ PO ₄ (8 g/L)	-	-	2,0	-
	MgCl ₂ (5 g/L)	-	-	2,0	-
	Ureia (25 g/L)	1,6	0,7	0,8	2,0
	Ácido Glucorónico (2g/L)	-	2,0	-	-
	Glucose (65 g/L)	-	2,0	-	-
	Hidrocloridrato de Glucosamina (33 g/L)	-	2,0	-	-
Compostos bioativos		Massa (mg)	Massa (mg)	Massa (mg)	Massa (mg)
Compostos Bioativos	α- amilase	180	-	-	-
	Ácido Úrico	3	-	-	-
	Mucina	5	-	-	-
	BSA	-	200	200	360
	Pepsina	-	250	-	-
	Pancreatina	-	300	1800	-
	Lipase	-	-	300	-
	Tripsina	-	-	3,2	-
	α-quimotripsina	-	-	34,8	-
	Bilis	-	-	-	6000

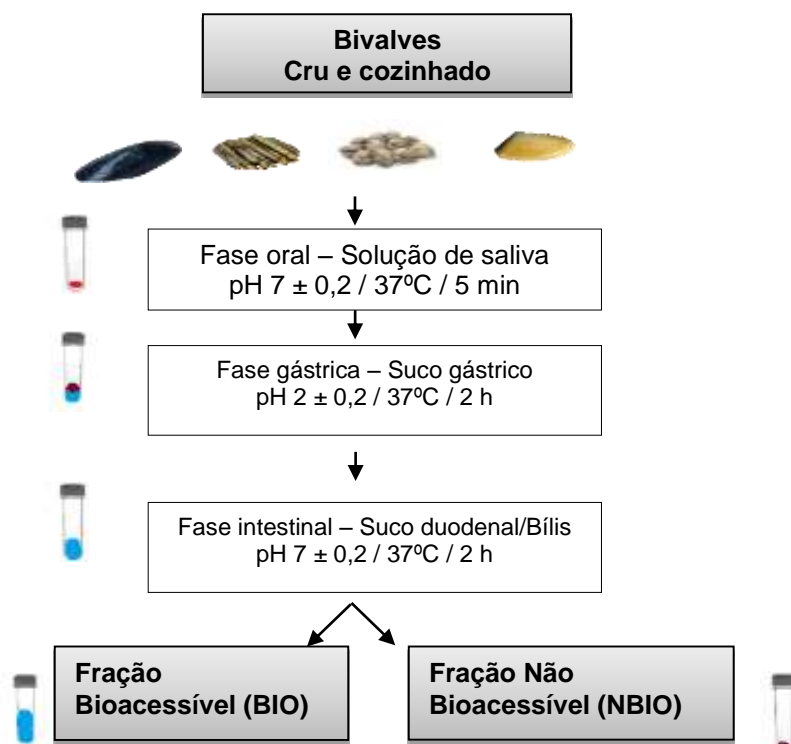
* Volume adicionado a cada reação de digestão *in vitro* (mistura do suco digestivo simulado e amostra) – porque pode ocorrer precipitação.

2.3.2 Protocolo da digestão in vitro

O protocolo utilizado encontra-se esquematizado na figura 8. Foram utilizados cerca de 1,5 g de cada amostra de bivalves previamente homogeneizada, cru e cozinhado para a realização da digestão *in vitro*. A digestão foi realizada em triplicado a 37°C utilizando um agitador rotativo (25 rpm; LSCI, Portugal). Inicialmente foram adicionados 4 mL da solução de saliva e incubou-se durante 5 minutos, a pH $7,0 \pm 0,2$. Posteriormente foram adicionados 8 mL da solução de suco gástrico às amostras e, em seguida, foram incubadas durante 2 horas, a pH $2,0 \pm 0,2$. Por fim, adicionaram-se, simultaneamente, 8 mL da solução de suco duodenal, 4 mL da solução de bÍlis, 1,33 mL de NaHCO_3 (84,7 g/L) e 224 µl de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (22,2 g/L). As amostras foram novamente incubadas durante 2 horas, a pH $7 \pm 0,2$. Para evitar degradação/inibição das enzimas, cada fluido digestivo foi preparado imediatamente antes de iniciar o protocolo da digestão. O pH foi ajustado antes de cada passo da digestão, com soluções de HCl (1 M) e NaOH (1 M).

No final da digestão, as amostras foram colocadas em gelo e centrifugadas a 2,750 g, durante 10 minutos a 10 °C, de modo a separar a fração bioacessível (BIO) e o *pellet* que corresponde à fração não digerida- fração não bioacessível (NBIO).

Figura 8- Representação esquemática do protocolo da digestão in vitro.
Adaptado de Braga et al., 2016



2.3.3 Eficiência da digestão - determinação da proteína

Para confirmar a eficiência da digestão *in vitro*, foram determinados os níveis de proteína totais nas amostras antes da digestão (AD) e nas frações bioacessível (BIO) e não bioacessível (NBIO), utilizando um analisador automático de azoto/proteína FP-528 DSP (LECO, St. Joseph, E.U.A; limite de detecção = 0,84 mg N). A curva padrão de calibração foi realizada com EDTA e seguindo a metodologia descrita por Saint-Denis & Goupy (2004).

A recuperação da proteína (%) foi definida pelo seguinte rácio: $(BIO + NBIO) \times 100/AD$, onde BIO + NBIO representam a soma dos níveis de proteína detetados nas frações bioacessível (BIO) e não bioacessível (NBIO), e AD é a quantidade de proteína detetada na amostra de molusco bivalve inicial, antes da digestão.

Os níveis de proteína na fração bioacessível (%) foram calculados da seguinte forma:

$BIO \times 100/ (BIO + NBIO)$. Por outro lado, os níveis de proteína na fração não bioacessível (%) foram calculados segundo o rácio: $NBIO \times 100/ (BIO + NBIO)$.

A recuperação da proteína (%) obtida para as várias amostras de bivalves cruas e cozinhadas após o processo de digestão *in vitro* variou entre os 90 e os 100%. Os níveis de proteína na fração bioacessível (%) variaram entre 75,7 e 100,0 % para as amostras de bivalves cruas e entre 65,0 e 83,7 % para as amostras de bivalves cozinhadas.

2.4 Análise das biotoxinas marinhas

A determinação do ácido ocadaico, dinofisistoxinas e seus derivados foi realizada de acordo com o método de referência europeu para a determinação de toxinas lipofílicas em bivalves (EURLMB, 2015).

O método baseia-se na extração das toxinas com metanol (MeOH) 100%, a partir do tecido homogeneizado. Os extratos são posteriormente filtrados e diretamente analisados pelo método de cromatografia líquida associado a espectrometria de massa (LC-MS/MS), a fim de detetar a presença de AO livre, DTX1 livre e DTX2 livre. Para se determinar o conteúdo total de toxinas do grupo AO, é necessário realizar uma hidrólise alcalina a partir do extrato de metanol antes de se analisar através de LC-MS/MS, com o objetivo de converter as formas esterificadas do AO e / ou DTXs na toxina principal AO e/ou DTX1 ou DTX2 (Rodrigues & Vale, 2009). Após hidrólise, os extratos são filtrados e analisados por LC-MS/MS. A separação cromatográfica é realizada por eluição de gradiente.

2.4.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados na extração e análise das biotoxinas marinhas foram de grau analítico ou superior. Metanol (p.a $\geq 98,8\%$, *Sigma-Aldrich*), Metanol (*LC-MS grade, Fluka*), Acetonitrilo (*LC-MS grade, Fluka*), Formato de amônio ($\geq 99\%$ pureza, *Fluka*), Ácido Fórmico (98 % p.a, *Roth*), Ácido hidrolórico (37 %, *Panreac*), Hidróxido de sódio ($\geq 99\%$ p.a., *Merck*). A água foi purificada utilizando o sistema *Milli-Q 185 Plus* da *Millipore*. As soluções de referência padrão certificadas do ácido ocadaico (*CRM-AO-c*) e dinofisistoxina-2 (*CRM-DTX2*) foram obtidas através do programa de Materiais de Referência Certificados do Instituto de Biociências Marinhas, *National Research Council (NRC, CANADA)*.

2.4.2 Extração das biotoxinas marinhas

2.4.2.1 Extração dos tecidos e pellets

Sucintamente, 2 g de tecido homogeneizado dos bivalves (cru e cozinhado) e da fração não digerida (não - bioacessível) foram extraídos, com o auxílio do vórtex, após adição de 9,0 mL de MeOH. As amostras foram centrifugadas a 2,000 g (10 minutos) e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrifuga. O restante tecido foi extraído novamente com 9,0 mL de MeOH, homogeneizado com misturador Polytron (*Kinematica, Suíça*) e em seguida, foi centrifugado nas mesmas condições. Posteriormente, os sobrenadantes (resultantes das centrifugações) foram combinados e o volume ajustado para 20 mL com MeOH. Uma alíquota deste extrato foi filtrada através de um filtro de seringa (0,2 μm) e 10 μL foram injetados para o sistema LC-MS/MS, a fim de determinar o ácido ocadaico, DTX1 e DTX2 livres. Para hidrolisar as amostras, adicionou-se 313 μL de NaOH (2,5M) a 2,5 mL do extrato metanólico da amostra num tubo teste que, posteriormente foi homogeneizado no vórtex (30 segundos) e aquecido a 76 °C (40 minutos) no bloco de aquecimento (*Grant, UK*). A amostra foi deixada arrefecer até atingir a temperatura ambiente e neutralizada com 313 μL de HCl (2,5 M), em seguida foi filtrada através de um filtro de seringa (0,2 μm), e 10 μL foram injetados para o sistema LC-MS/MS.

2.4.2.2 Extração da fração bioacessível

Relativamente à extração da fração bioacessível, o protocolo foi semelhante, excetuando alguns passos intermédios e foi adaptado de Braga *et al.*, 2016. De um modo breve, a técnica da extração consistiu na adição de 3,0 mL de amostra (fase bioacessível) a 5,0 mL de diclorometano (CH_2Cl_2), seguido da sua mistura com o auxílio do vórtex. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 2000 g (2 minutos) e a fase aquosa descartada. A fase orgânica foi a evaporar a 40 °C com pressão reduzida num sistema de evaporação RapidVap (Labconco, E.U.A), que combina forças suaves- movimento de vórtex, calor seco e vácuo para reduzir as amostras à secagem completa. O extrato resultante da evaporação foi reconstituído com 3 mL de MeOH. Tal como descrito na secção 2.3.1.1, uma alíquota foi filtrada e 10 µL foram injetados no LC-MS/MS e outra alíquota foi hidrolisada previamente à injeção no sistema cromatográfico, de forma a determinar o conteúdo do grupo de toxinas de ácido ocadaico livre e total, respetivamente. A extração com CH_2Cl_2 , que constitui uma modificação do método, demonstrou uma boa recuperação ($93 \pm 7 \%$) depois de se contaminar as amostras com AO ($93 \pm 7 \%$) e DTX2 ($98 \pm 5 \%$) .

2.4.3 Determinação das Biotoxinas por LC-MS/MS

As toxinas foram determinadas por LC-MS/MS, através de um cromatógrafo *Dionex Ultimate 3000 LC system* (Thermo Scientific, E.U.A) acoplado a um espectrómetro de massa triplo quadrupolo *TSQ Quantum™ Access Max* (Thermo Scientific, E.U.A) equipado com uma fonte aquecida de ionização por *Electrospray HESI-II* (Thermo Scientific, E.U.A). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna cromatográfica *Accuore™* (RP-MS) (150 x 2,1 mm, 2,6 µm) de fase reversa protegida por uma pré-coluna *Accuore™* (RP-MS) (10 x 2,1, 2,6 µm). A fase móvel A era constituída por água ultrapura *Milli-Q*, formato de amónio (2 mM) e ácido fórmico (50 mM) e a fase móvel B era constituída por acetonitrilo (95%), formato de amónio (2 mM) e ácido fórmico (50 mM). Foi utilizado um gradiente de eluição com um fluxo de 0,4 mL/min nas seguintes condições: 0-1 min, gradiente de 50 a 0 % de eluente A; 1-4 min mantem 0% de eluente A; 4-5 min gradiente de 0 a 50 % de eluente A; 5-6 min permanece 50% de eluente A.

A deteção foi realizada em modo MRM. Duas transições MRM foram monitorizadas em polaridade negativa: m/z 803> 255 para a quantificação e 803>563 para confirmação do AO e DTX2. As soluções padrão utilizadas para a construção da curva de calibração tinham as seguintes concentrações: 2,0; 7,1; 20,3; 40,6; 68,0 ng/mL. O limite de deteção foi 0,4 e 0,6 ng/mL para o AO e DTX2, respetivamente.

Foram utilizados os fatores de equivalência tóxica estabelecidos pela EFSA, (2008) para o cálculo das toxinas do grupo AO em termos de ácido ocadaico equivalentes: OA = 1, DTX1 = 1, DTX2 = 0,6. Apesar da toxicidade da DTX3 ser considerada inferior, aplica-se o valor de

TEF para a DTX3 igual ao da toxina não esterificada correspondente (AO, DTX1 e DTX2) (EFSA, 2008).

2.5 Análise estatística dos resultados

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado utilizando o programa *SigmaPlot* Versão 10. Os testes One-way ANOVA seguido do teste Tukey HSD foram realizados para testar diferenças significativas de bioacessibilidade das toxinas AO entre as diferentes espécies. Os dados foram previamente testados para a normalidade e homogeneidade de variâncias pelo teste Kolmogorov-Smirnov e pelo teste de Levene, respetivamente. O teste de *t-Student* foi realizado para testar diferenças significativas de bioacessibilidade das biotoxinas entre amostras cruas e amostras cozinhadas. As diferenças foram consideradas significativas a $p < 0,05$. Diferenças significativas entre AO esterificado na fração AD e BIO, bem como de AO livre nestas duas frações foram testadas através do teste de *t-Student*

3. Resultados

3.1 Toxicidade das amostras de moluscos bivalves cruas

A toxicidade das amostras de bivalves crus variou entre 360 e 946 µg de AO equivalente/kg no mexilhão, entre 190 e 340 µg de AO equivalente/kg no berbigão, entre 116 e 231 µg de AO equivalente/kg para a conquitilha e finalmente entre 93 e 254 µg de AO equivalente/kg para o lingueirão (tabela 6). O perfil de toxinas encontrado no mexilhão foi constituído por aproximadamente 28 % de AO livre, 27 % de ésteres de AO, 40 % de DTX2 livre e 5 % de ésteres de DTX2. Nas amostras de berbigão, o perfil de toxinas do grupo AO foi dominado pelas formas esterificadas: 81% de ésteres de AO, 16% ésteres de DTX2, 4% de AO livre. A DTX2 livre não foi detetada nas amostras de berbigão analisadas. Nas amostras de conquitilha foi determinado um perfil de toxinas similar ao registado nas amostras de mexilhão e constituído por 26% de AO livre, 35% de ésteres de AO, 29% de DTX2 livre e 11% de ésteres de DTX2. Por último, o perfil de toxinas encontrado nas amostras de lingueirão foi dominado por formas esterificadas, como também observado no berbigão, sendo 84% do perfil constituído por ésteres do AO, 11% ésteres de DTX2 e apenas 5% de AO livre. Tal como nas amostras de berbigão, também não foi detetado DTX2 nas amostras de lingueirão analisadas (tabela 6).

Tabela 6- Ácido ocadaico (AO), Dinofisistoxina-2 (DTX2) e respetivas formas esterificadas em amostras de mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*), berbigão (*Cerastoderma edule*), conquitilha (*Donax spp.*) e lingueirão (*Solen marginatus*) apanhados na costa portuguesa.

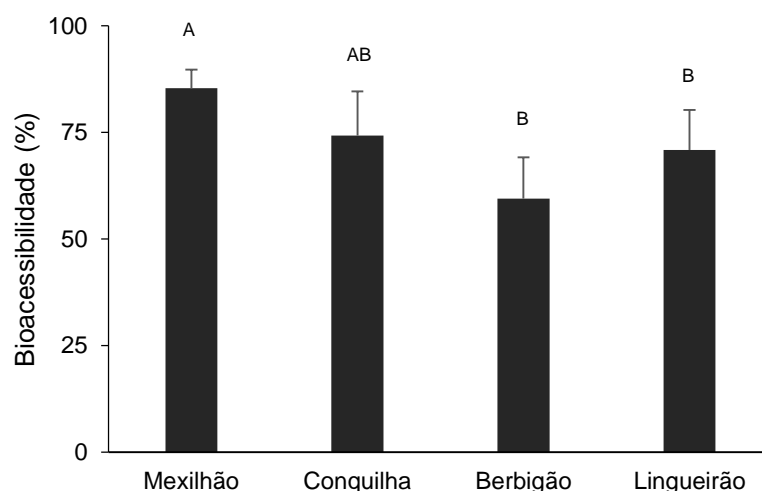
Espécie	Data colheita	AO equiv. (µ/kg)	Fração molar Toxina (%)			
			AO	AO esterificado	DTX2	DTX2 esterificado
Mexilhão	Ago-15	359,7	26,0	19,0	50,7	4,3
	Ago-15	946,4	39,2	23,3	33,9	3,6
	Ago-15	381,9	9,4	17,3	69,9	3,4
	Ago-15	522,0	30,7	34,3	30,7	4,3
	Ago-15	435,2	30,2	29,3	34,4	6,1
	Jul- 15	471,8	32,9	38,0	17,8	11,3
Berbigão	Ago-15	298	2,4	72,9	nd	24,6
	Ago-15	273,4	5,1	94,9	nd	nd
	Set- 15	339,8	2,1	81,8	nd	16,1
	Set- 15	310,1	3,8	80,7	nd	15,5
	Set- 15	190	4,2	72,8	nd	23,0
Conquitilha	Ago-15	231,1	12,1	28,9	47,2	11,8
	Ago-15	115,6	37,4	19,9	23,3	19,4
	Set- 15	202,5	26,9	54,9	16,1	2,1
Lingueirão	Ago-15	93,3	8,0	74,6	nd	17,5
	Set- 15	170,1	4,7	86,9	nd	8,4
	Set- 15	103,4	5,9	94,1	nd	nd
	Out- 15	253,9	2,7	81,3	nd	16,0

nd: não detetado

3.2 Bioacessibilidade das toxinas do grupo AO

A bioacessibilidade do conteúdo total das toxinas do grupo AO estimada através deste modelo de digestão *in vitro* foi mais elevada no mexilhão ($85,4 \pm 4,3\%$), seguido da conquinha ($74,2 \pm 10,4\%$), lingueirão ($70,8 \pm 9,4\%$) e, por último, o berbigão ($59,4 \pm 9,7\%$) (Figura 9). Observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras de mexilhão e as amostras de berbigão e entre as amostras de mexilhão e lingueirão. A quantidade restante de toxina, que não foi libertada da matriz do molusco bivalve para os sucos digestivos durante o processo de digestão, foi encontrada na fração NBIO. Ligeiras diferenças entre o valor da toxina no alimento e o somatório das frações BIO e NBIO ($< 8\%$) (dados não exibidos) indicam que as perdas associadas ao método de extração e análise são reduzidas e negligenciáveis.

Figura 9- Bioacessibilidade (% média \pm DP) do conteúdo total de toxinas do grupo AO em amostras cruas de mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*), berbigão (*Cerastoderma edule*), conquinha (*Donax spp.*) e lingueirão (*Solen marginatus*) colhidos na costa portuguesa. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre a % de bioacessibilidade das diferentes espécies ($p < 0,05$).



O mexilhão e a conquinha foram selecionados para este estudo devido à sua capacidade reduzida de biotransformar as toxinas DSP, no caso oposto selecionou-se o berbigão e o lingueirão devido à sua elevada capacidade de esterificar o AO, DTX1 e 2. Na figura 10 está ilustrada a bioacessibilidade (%) das toxinas na sua forma livre (AO e DTX2) e esterificada (DTX3), nas quatro espécies estudadas. Como o termo bioacessibilidade se refere à quantidade de uma substância ou composto que é libertado da matriz alimentar para os sucos digestivos, está implícito que a quantidade máxima encontrada após o processo digestivo é a quantidade inicialmente presente na matriz alimentar ingerida. No entanto, a % de bioacessibilidade das toxinas livres encontrada nas amostras de mexilhão e conquinha foi

superior a 100 %, o que significa que foram encontradas quantidades destes compostos nos sucos digestivos superiores às quantidades presentes na matriz alimentar inicial. Este aumento de toxinas não foi observado na matriz de berbigão e lingueirão. De modo a entender a quantidade de toxinas livres determinadas na fração BIO (sucos digestivos) superior à quantidade de toxina encontrada na fração inicial antes da digestão analisou-se a variação do perfil de toxinas em cada fração (antes da digestão e bioacessível). Conforme ilustrado na figura 11, o aumento do AO livre na fração bioacessível das amostras cruas de mexilhão é acompanhado de uma marcada diminuição dos ésteres derivados de AO. De um modo similar, pode-se observar um aumento do AO e a diminuição dos respectivos ésteres nas amostras de conchilha. Em contrapartida, não se observou o aumento da DTX2 e a diminuição dos seus ésteres derivados nestas duas espécies. Também para as amostras de berbigão e lingueirão, cujo perfil de toxinas é dominado pelas formas esterificadas não se observou um aumento das toxinas livres após o processo digestivo.

Figura 10- Bioacessibilidade (% , média \pm DP) das toxinas livres e esterificadas em amostras cruas de a) mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*), b) conchilha (*Donax spp.*), c) berbigão (*Cerastoderma edule*), e d) lingueirão (*Solen marginatus*).

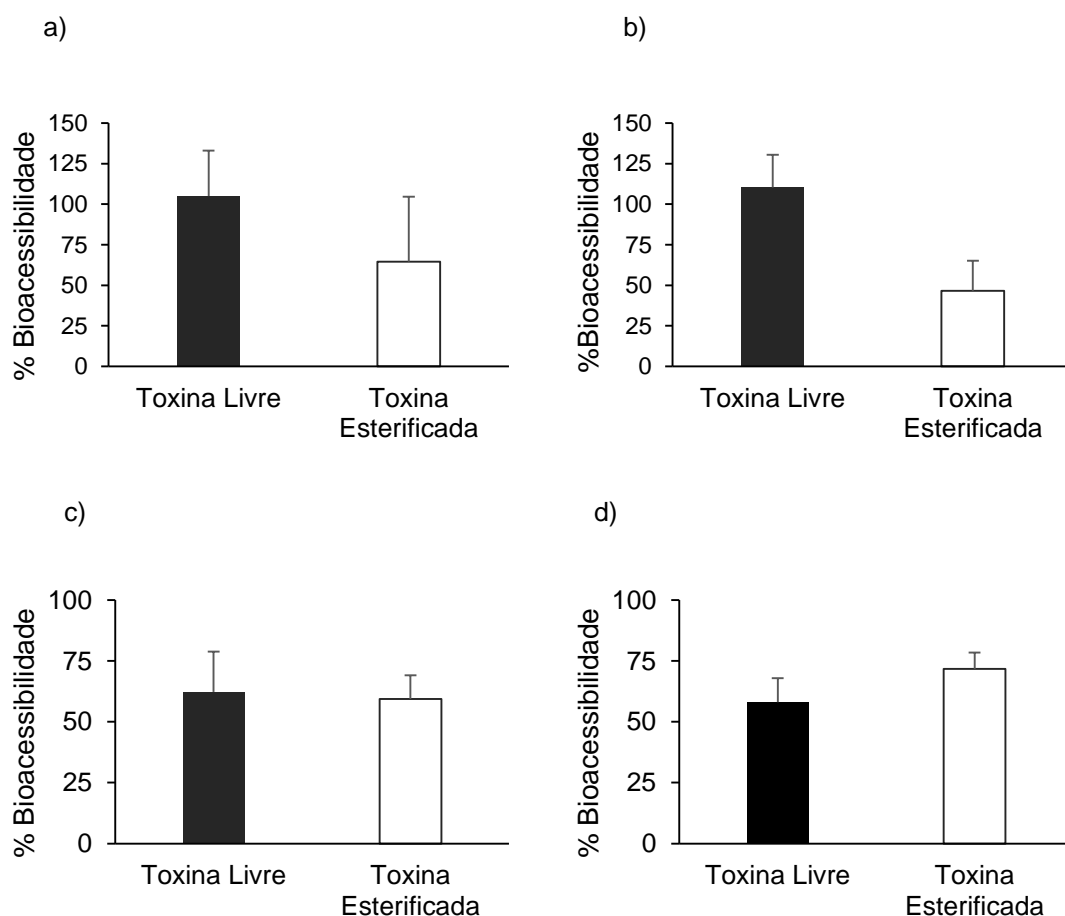
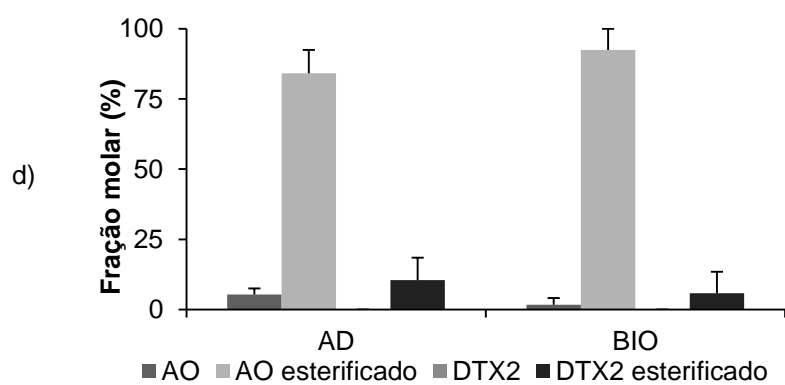
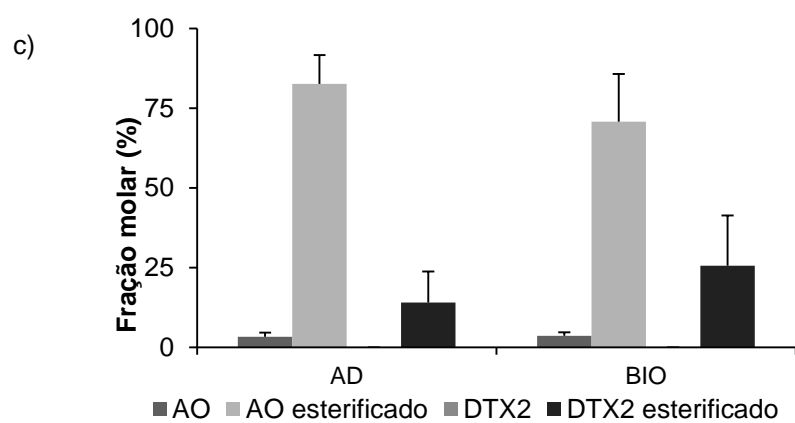
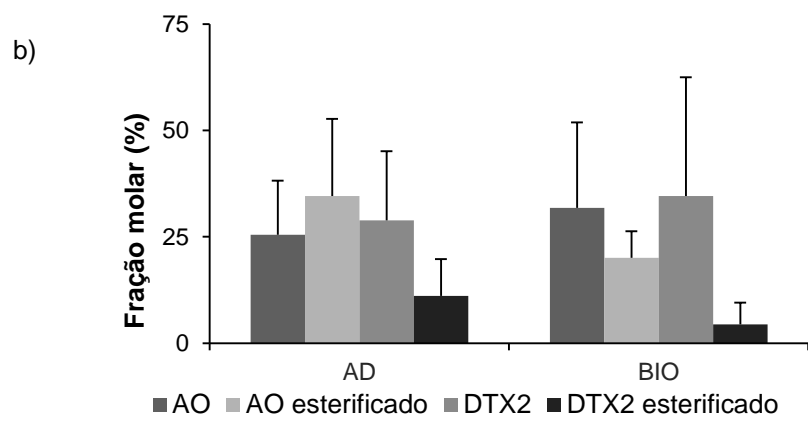
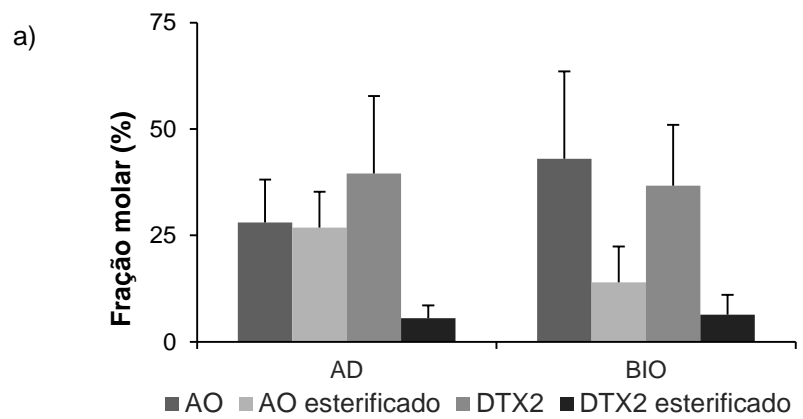


Figura 11- Perfil de toxinas do grupo AO (% , média \pm DP) em amostras cruas antes da digestão (AD) e na fração bioacessível (BIO) de a) mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*), b) conchilha (*Donax spp.*), c) berbigão (*Cerastoderma edule*) e d) lingueirão (*Solen marginatus*).



3.3 Toxicidade das amostras de moluscos bivalves cozinhadas

Nas amostras de mexilhão e berbigão sujeitas a cozedura ao vapor, a toxicidade variou entre 386 e 1166 µg AO equivalente/kg no mexilhão e entre 489 e 658 µg AO equivalente/kg no berbigão (tabela 7). Verificou-se um aumento de concentração da toxina em todas as amostras de mexilhão e berbigão. O processo de cozedura leva a uma perda de fluidos, mas devido à natureza lipofílica das toxinas do grupo AO, estas não são libertadas resultando num aumento de concentração da toxina. O perfil de toxinas manteve-se idêntico em ambas as espécies após o tratamento térmico.

Tabela 7- Ácido ocadaico (AO), Dinofisistoxina- 2 (DTX2) e os seus ésteres derivados em amostras de mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*), berbigão (*Cerastoderma edule*) sujeitas a tratamento térmico.

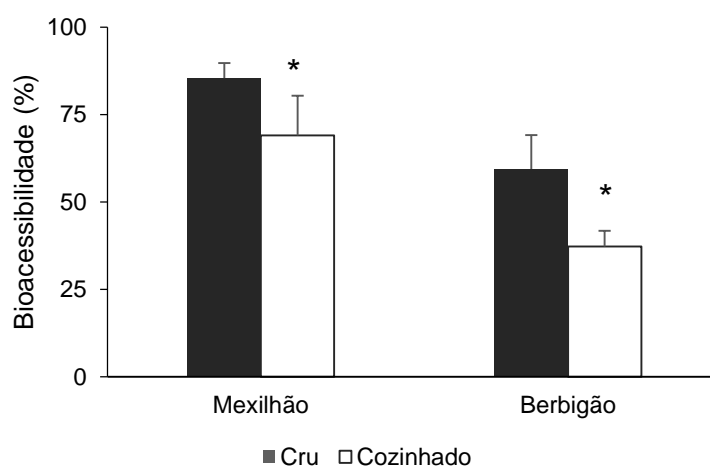
Espécie	AO equiv. (µ/kg)	Fração molar Toxina (%)			
		AO	AO esterificado	DTX2	DTX2 esterificado
Mexilhão	641,2	29,3	28,3	30,1	12,3
	1166,4	53,0	17,0	28,2	1,7
	385,8	17,2	14,6	68,2	nd
	769,7	46,1	23,9	25,1	4,8
	581,0	53,8	9,2	37,0	0
	540,8	37,7	39,4	12,6	10,2
Berbigão	492,6	1,7	76,9	nd	21,3
	489,2	2,8	97,2	nd	nd
	612,9	1,6	80,9	nd	17,5
	658,2	1,5	78,4	nd	20,1
	490,4	1,4	69,0	nd	29,7

3.4 Bioacessibilidade das toxinas do grupo AO após cozedura

O efeito da cozedura ao vapor resultou numa diminuição significativa da percentagem de bioacessibilidade do conteúdo total das toxinas do grupo AO nas duas espécies (Figura 12).

Tal como se verificou nas amostras cruas, o mexilhão teve uma maior percentagem de bioacessibilidade ($69,0 \pm 11,4 \%$) do que o berbigão ($37,3 \pm 4,4 \%$).

Figura 12- Bioacessibilidade (% média \pm DP) do conteúdo total de toxinas do grupo AO em amostras cozinhadas de mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*) e berbigão (*Cerastoderma edule*) colhidos na costa portuguesa. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cru e cozinhado estão assinaladas com *



4. Discussão

Neste estudo foi estudada a bioacessibilidade de AO, DTX2 e DTX3 em bivalves crus e cozinhados. Se elevadas percentagens de bioacessibilidade (> 80%) do AO e dos seus derivados foram observadas em amostras cruas de mexilhão, o mesmo não se verificou nas amostras de berbigão, particularmente após cozedura (< 50%).

Das quatro espécies estudadas, duas apresentam regularmente um perfil de toxinas composto por toxinas livres e esterificadas (o mexilhão e a conculha) e outras duas espécies com um perfil de toxinas altamente dominado (> 90%) por toxinas nas suas formas esterificadas (o berbigão e lingueirão). Destas espécies analisadas verificou-se uma maior eficiência do processo digestivo em libertar as toxinas das matrizes de mexilhão e conculha. Já anteriormente Braga et al., (2016) tinha estimado a bioacessibilidade de AO livre e esterificado em amostras de mexilhão e conculha. Os resultados do presente trabalho confirmam essas observações anteriores. Ao diversificar o leque de espécies analisadas e incluir um perfil de toxinas mais complexo e o efeito de um tratamento culinário, o presente trabalho introduz novos dados relevantes para uma avaliação de risco mais rigorosa conforme de seguida se discute.

A bioacessibilidade do conjunto total das toxinas do grupo AO que ocorrem no sul da Europa, *i.e.* AO, DTX2 e as suas respetivas formas esterificadas, foi estimada em dois tipos de bivalves: 1) mexilhão e conculha, que se caracterizam por uma capacidade reduzida de biotransformar as toxinas DSP e 2) berbigão e lingueirão como tendo alta capacidade de esterificação (Vale & Sampayo, 2002a).

Ao analisar cada toxina individualmente, foi observado um aumento de AO livre na fração bioacessível nas amostras de mexilhão e conculha, sendo este aumento mais expressivo nas amostras de mexilhão. O excesso de AO livre está relacionado com o decréscimo de ésteres de ácidos gordos do AO na fração bioacessível. Sendo que este decréscimo não é compensado por um incremento na fração NBIO, que corresponde aos resíduos resultantes do processo de digestão e que não ficam disponíveis para absorção. Sugere-se que o aumento de AO se deva a uma conversão dos ésteres de ácidos gordos (DTX3) no seu composto parental durante a digestão. A conversão da DTX3 em compostos de origem no trato gastrointestinal humano tem sido mencionada em alguns estudos, mas não foi ainda demonstrada inequivocamente (García *et al.*, 2005, Doucet, Ross, & Quilliam, 2007).

Os ésteres derivados podem ser enzimaticamente convertidos nos compostos parentais através das lípases e da colesterol esterase (Doucet, Ross, & Quilliam, 2007, EFSA, 2008). Após uma intoxicação alimentar que ocorreu no Chile devido à ingestão de mexilhão contaminado apenas com DTX3, as amostras de fezes dos pacientes afetados revelaram a

presença de DTX1. O composto parental foi a única toxina encontrada e supõe-se que a transformação ocorreu no estômago dos pacientes afetados (García *et al.*, 2005).

Embora se tenham observado maiores quantidades de AO na fração bioacessível do que na matriz dos moluscos bivalves antes da digestão, não se observou um aumento da DTX2 relacionado com a diminuição dos seus ésteres. Um aumento das toxinas livres, AO e DTX2, também não foi observado nas amostras de berbigão e lingueirão. DTX3 é a designação para uma ampla gama de derivados do AO, DTX1 e DTX2, esterificados com ácidos gordos saturados e insaturados. Quando se relatou pela primeira vez a presença de DTX3 em moluscos bivalves japoneses, apenas 6 ésteres de ácidos gordos de DTX1 foram descritos por Yasumoto *et al.*, (1985). Nos dias de hoje é reconhecido que a DTX3 representa uma mistura cada vez mais complexa de produtos do metabolismo dos moluscos bivalves. Pelo menos 30 ésteres de ácidos gordos de AO e DTX2 foram recentemente identificados em bivalves das águas europeias (Gerssen, Mulder, & de Boer, 2011), sendo o ácido palmítico (16:0), ácido palmitoleico (16:1), ácido eicosapentaenóico (20:5) e ácido docosahexaenóico (22:6), os ácidos gordos mais comuns em bivalves (Lacaze, Stobo, Turrell, & Quilliam, 2007), bem como aqueles que esterificam no grupo C7 OH do AO (Vale, 2006, Torgersen, Wilkins, Rundberget, & Miles, 2008). No entanto, a determinação da concentração de cada composto é dificultada pela falta de padrões analíticos, que é essencial para a caracterização confiável da variabilidade de ésteres do AO, DTX1 e 2 entre as espécies de bivalves.

Baseado no padrão não comercial do éster 7- O - acil com ácido palmítico (palOA), Villar-González, *et al.*, (2008) investigaram a presença deste éster do AO em amostras de bivalves provenientes de Espanha. Verificaram que todas as amostras estavam contaminadas com palOA, no entanto o perfil tóxico variou entre as espécies. Aproximadamente 40 % do total de ésteres do AO encontrados nas amostras de mexilhão (*M. galloprovincialis*) foram palOA, praticamente 90 % nas amostras de vieira (*Pecten maximus*) e apenas 27% nas amostras de lingueirão (*Ensis arcuatus*) (Villar-González *et al.*, 2008). Apesar do palOA também estar presente em amostras de berbigão (*C. edule*) e amêijoia (*Venerupis pullastra*), duas espécies que normalmente têm um perfil de toxinas altamente dominado pelas formas esterificadas, Villar-González *et al.*, (2008) não foram capazes de quantificar o palOA devido à coeluição de diferentes compostos com o mesmo tempo de retenção do palOA.

Os mexilhões analisados neste estudo, bem como aqueles estudados por Braga *et al.* (2016) podem ter um perfil diferente de ésteres de AO do que os berbigões, sendo os presentes no mexilhão, ou parte deles, mais facilmente convertidos nos seus compostos parentais nas condições *in vitro* utilizadas.

Diferenças entre as matrizes também podem afetar a reação de hidrólise que converte os ésteres de ácidos gordos. Ao desenvolver procedimentos para a hidrólise enzimática dos

ésteres de AO, utilizando lípases de pâncreas de porcino, Doucet *et al.*, (2007) observaram uma hidrólise eficaz de DTX3 purificada, no entanto houve uma redução significativa da eficiência da reação devido ao efeito da matriz do mexilhão. No entanto, nem o berbigão nem nenhuma outra espécie de molusco bivalve foi testada por Doucet *et al.*, (2007) pelo que se desconhece possíveis efeitos da matriz, tirando o mexilhão, nesta reação de hidrólise.

Considerando que apenas alguns derivados de ácidos gordos, como aqueles encontrados no mexilhão, mas não no berbigão, são convertidos nos seus compostos parentais durante o processo digestivo, é importante analisar e avaliar a toxicidade de cada éster individual em particular daqueles que não se convertem de volta a AO, DTX1 ou DTX2. Os poucos dados sobre a toxicidade da DTX3 indicam que os ésteres têm reduzida toxicidade após injeção intraperitoneal. em ratinhos (Yasumoto *et al.*, 1985) e a ligação de afinidade para as PP1 e PP2A, os principais alvos do AO em células eucariotas, é bastante mais fraca do que no AO (Takai *et al.*, 1992). A reduzida atividade biológica da DTX3 pode estar relacionada com o comprimento e saturação da cadeia lateral do ácido gordo (Yanagi *et al.*, 1989).

Para o controlo oficial das toxinas do grupo AO em moluscos bivalves, realiza-se uma hidrólise alcalina para converter o total de derivados de ácidos gordos, sendo aplicado o TEF do respetivo composto parental (EURLMB, 2015, EFSA, 2008). De acordo com os dados obtidos no presente estudo, esta abordagem pode ser demasiado conservadora uma vez que a toxicidade da DTX3 é menor do que a toxicidade dos compostos parentais e apenas uma parte deles são convertidos durante a digestão humana.

Os bivalves são maioritariamente consumidos cozinhados em vez de crus (Marques *et al.*, 2011). O efeito da cozedura a vapor na concentração das toxinas do grupo AO foi previamente estudado por Blanco *et al.* (2015). De uma forma semelhante ao estudo de Blanco *et al.* (2015), verificou-se um aumento substancial da concentração das toxinas nas amostras de mexilhão e berbigão sujeitas a tratamento térmico. Apesar do aumento da concentração das toxinas após a cozedura a vapor, observou-se uma diminuição significativa das percentagens de bioacessibilidade em relação às amostras cruas. Estes resultados quando combinados com dados de estudos futuros sobre biodisponibilidade das toxinas DSP, como por exemplo, a fração de toxinas absorvida que atinge o seu alvo fisiológico, são de alta relevância para melhor se avaliar o risco das toxinas do grupo AO.

5. Conclusão

A bioacessibilidade das toxinas do grupo AO em moluscos bivalves não é total, o que significa que a quantidade disponível para absorção destas toxinas no trato gastrointestinal humano é menor do que a quantidade ingerida.

Foram observadas diferenças na bioacessibilidade entre espécies, sendo as percentagens mais baixas de toxina libertada da matriz encontradas nas amostras de berbigão e as mais altas nas amostras de mexilhão. O mexilhão é conhecido por biotransformar de uma forma menos eficiente as toxinas do grupo AO nos seus ésteres derivados, no entanto estes compostos menos tóxicos podem ser convertidos nos seus compostos parentais mais tóxicos, no trato gastrointestinal durante o processo digestivo. Este estudo destaca a necessidade de prosseguir os trabalhos sobre a caracterização da variabilidade dos ésteres do AO, DTX1 e 2 entre as diferentes espécies de moluscos bivalves, bem como a sua toxicidade e capacidade de conversão. A toxicidade das amostras de moluscos bivalves não deve considerar apenas as formas livres da toxina mais o total de ésteres que são quantificados nos programas de monitorização após hidrólise alcalina, mas deve ter-se em atenção a identificação e a abundância dos ésteres individuais e a sua capacidade para serem convertidos nos compostos parentais durante o processo digestivo. Os tratamentos térmicos, como a cozedura a vapor, podem aumentar significativamente a concentração da toxina na matriz inicial, mas reduzem a sua bioacessibilidade. O presente estudo fornece novos dados relevantes para uma avaliação de risco mais precisa, indicando que a quantidade máxima de toxina que pode estar biodisponível para absorção é menor que a quantidade ingerida.

6. Referências Bibliográficas

- Aune, T., Larsen, S., Aasen, J. A. B., Rehmann, N., Satake, M., & Hess, P. (2007). Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice. *Toxicon*, 49 (1), pp. 1–7.
- Blanco, J., Arévalo, F., Correa, J., Porro, M. C., Cabado, A. G., Vieites, J. M., & Moroño, A. (2015). Effect of the industrial steaming on the toxicity, estimated by LC–MS/MS, of mussels exposed for a long time to diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins. *Food Chemistry*, 177, pp. 240–247.
- Braga, A., Alves, R., Maulvault, A., Barbosa, V., Marques, A., & Costa, P. (2016). In vitro bioaccessibility of the marine biotoxin okadaic acid in shellfish. *Food and Chemical Toxicology*, 89, pp. 54–59.
- Burri, S., & Vale, P. (2006). Contaminação de bivalves por DSP: risco de episódios de gastroenterites numa região de toxicidade endêmica. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 24(1), pp. 115–124.
- Cachola, R., & Campos, C. (2006). Redefinição das zonas de produção de bivalves nos sistemas lagunares do Algarve no âmbito do programa de monitorização microbiológica. *Relatórios Científicos E Técnicos, Serie Digital*, pp. 1–43.
- Cardoso, C., Afonso, C., Lourenço, H., Costa, S., & Nunes, M. L. (2015). Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk–benefit evaluation of food. *Trends in Food Science & Technology*, 41 (1), pp. 5–23.
- Decreto-Lei 68/2012, de 20 de Março, *Diário da República*, N.º57- I Série. Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território Lisboa.
- Despacho n.º 15264/2013 de 22 de Novembro, *Diário da República*, N.º 227- II Série. Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território. Lisboa.
- Doucet, E., Ross, N. N., & Quilliam, M. A. (2007). Enzymatic hydrolysis of esterified diarrhetic shellfish poisoning toxins and pectenotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (1), pp. 335–342.
- Encyclopedia of Life. (2012a). Acedido em Jul. 19, 2016, disponível em <http://www.eol.org/pages/2942466/overview>
- Encyclopedia of Life. (2012b). Acedido em Jul. 19, 2016, disponível em http://www.eol.org/data_objects/22887442
- EURLMB. (2015). *EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS, version 5*. Disponível em http://aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/metodos_analiticos_de_desarrollo/EU-Harmonised-SOP-LIPO-LCMSMS_Version5.pdf
- EFSA. (2008). Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues. *The EFSA Journal*, pp. 1–62.
- FAO. (2004a). Marine Biotoxins. *Marine Biotoxins. FAO Food and Nutrition Paper 80*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em

<http://www.fao.org/docrep/007/y5486e/y5486e00.html>

- FAO. (2014). *The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Vol. 2014). Rome. Disponível em <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:THE+STATE+OF+WORLD+FISHERIES+AND+AQUACULTURE#0>
- Fisheries and Aquaculture Department. (2016a). Acedido em Jul. 19, 2016, disponível em <http://www.fao.org/fishery/species/3535/en>
- Fisheries and Aquaculture Department. (2016b). Acedido em Jul. 19, 2016, disponível em <http://www.fao.org/fishery/species/3529/en>
- Fux, E., McMillan, D., Bire, R., & Hess, P. (2007). Development of an ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins. *Journal of Chromatography A*, 1157 (1–2), pp. 273–280.
- García, C., Truan, D., Lagos, M., Santelices, J. P., Díaz, J. C., & Lagos, N. (2005). Metabolic transformation of dinophysistoxin-3 into dinophysistoxin-1 causes human intoxication by consumption of o-acyl-derivatives dinophysistoxins contaminated shellfish. *The Journal of Toxicological Sciences*, 30 (4), pp. 287–296.
- Gerssen, A., Mulder, P. P. J., & de Boer, J. (2011). Screening of lipophilic marine toxins in shellfish and algae: Development of a library using liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 685 (2), pp. 176–185.
- Gosling, E. (2003). *Bivalve Molluscs- Biology, Ecology and culture.* (1st ed.). United Kingdom Fishing News Books.
- Global Invasive Species Database. (2016). Acedido em Jul. 19, 2016, disponível em <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=102>
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125 (1), pp. 1–12.
- IPIMAR. (2008). *Produção, salubridade e comercialização dos moluscos bivalves em Portugal.* (I. Silva A., Helena; Batista, Ed.) *Publicações Avulsas do IPIMAR* (IPIMAR, Vol. 20). Lisboa.
- IPMA. (2015). *Amostragem e Transporte de Moluscos Bivalves e Gastrópodes Vivos para Determinação de Biotoxinas Marinhas.* Manual de procedimentos interno, pp. 1-6
- Lacaze, J.P., Stobo, L., Turrell, E., & Quilliam, M. (2007). Solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of free fatty acids in shellfish. *Journal of Chromatography A*, 1145 (1–2), pp. 51–57.
- Lawrence, J., Loreal, H., Toyofuku, H., Hess, P., Karunasagar, I., & Ababouch, L. (2011). *Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 551.* pp. 1-358
- Marques, A., Lourenço, H. M., Nunes, M. L., Roseiro, C., Santos, C., Barranco, A., Cencic, A. (2011). New tools to assess toxicity, bioaccessibility and uptake of chemical contaminants in meat and seafood. *Food Research International*, 44 (2), pp. 510–522.
- Matias, W. G., Traore, A., & Creppy, E. E. (1999). Variations in the distribution of okadaic

acid in organs and biological fluids of mice related to diarrhoeic syndrome. *Human & Experimental Toxicology*, 18 (5), pp. 345–350.

Moita, M., Palma, A., & Vilarinho, M. (2005). Blooms de Fitoplâncton na Costa Portuguesa. *Instituto de Investigação Das Pescas E Do Mar*, 31, pp. 1–5.

Moita, M. T., Pazos, Y., Rocha, C., Nolasco, R., & Oliveira, P. B. (2016). Toward predicting Dinophysis blooms off NW Iberia: A decade of events. *Harmful Algae*, 53, pp. 17–32.

Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, 30 (1), pp. 19–34.

Portaria n.º 27/2001, de 15 de Janeiro, *Diário da República*, nº 12 - II Série-B. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

Regulamento (CE) N.º 2074/2005 de 5 de Dezembro, *Jornal Oficial da União Europeia* L 338.

Regulamento (CE) N.º 853/2004 de 29 de Abril, *Jornal Oficial da União Europeia* L 139.

Regulamento (CE) N.º 854/2004 de 29 de Abril, *Jornal Oficial da União Europeia* L 226.

Regulamento (UE) N.º 15/2011 de 10 de Janeiro, *Jornal oficial da União Europeia* L 6.

Rodrigues, S. M., & Vale, P. (2009). Temperature and base requirements for the alkaline hydrolysis of okadaite's esters. *Toxicon*, 53 (7–8), pp. 806–809.

Saint-Denis, T., & Goupy, J. (2004). Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta*, 515 (1), pp. 191–198.

Soares, F., Almeida, C., & Cachola, R. (2012). Qualidade microbiológica dos bivalves da Ria Formosa - vinte anos de resultados. *Relatórios Científicos E Técnicos, Serie Digital*, pp. 1–47.

Spectrometry, S. C. for M. and M. (2014). Mass Spec History. Acedido em Set. 9, 2016, disponível em https://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms_details.php#Basics

Suganuma, M., Fujiki, H., Suguri, H., Yoshizawa, S., Hirota, M., Nakayasu, M., ... Sugimura, T. (1988). Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85 (6), pp. 1768–1771.

Takai, A., Murata, M., Torigoe, K., Isobe, M., Mieskes, G., & Yasumoto, T. (1992). Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship. *The Biochemical Journal*, 284, pp. 539–544.

Torgersen, T., Wilkins, A., Rundberget, T., & Miles, C. (2008). Characterization of fatty acid esters of okadaic acid and related toxins in blue mussels (*Mytilus edulis*) from Norway. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 22, pp. 1127–1136.

Vale, P. (2004). Biotoxinas marinhas Marine biotoxins. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99 (549), pp. 3–18.

Vale, P. (2006). Detailed profiles of 7-O-acyl esters in plankton and shellfish from the Portuguese coast. *Journal of Chromatography A*, 1128 (1–2), pp. 181–188.

- Vale, P., Botelho, M. J., Rodrigues, S. M., Gomes, S. S., & Sampayo, M. (2008). Two decades of marine biotoxin monitoring in bivalves from Portugal (1986–2006): A review of exposure assessment. *Harmful Algae*, 7 (1), pp. 11–25.
- Vale, P., & Sampayo, M. A. (1999). Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*, 37 (8), pp. 1109–1121.
- Vale, P., & Sampayo, M. A. (2002a). Esterification of DSP toxins by Portuguese bivalves from the Northwest coast determined by LC-MS—a widespread phenomenon. *Toxicon*, 40 (1), pp. 33–42.
- Vale, P., & Sampayo, M. A. (2002b). First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. *Toxicon*, 40 (7), pp. 989–996.
- Vasconcelos, V. (2013). *Marés vermelhas, organismos tóxicos e riscos para a saúde humana*.
- Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. J. M., & Sips, A. J. A. M. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43 (1), pp. 31–40.
- Versantvoort, C. H. M., Van de Kamp, E., & Rompelberg, C. J. M. (2004). *Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food* (Vol. 320102). Bilthoven
- Villar-González, A., Velasco, M., Gigirey, B. Ben, Yasumoto, T., & Botana, L. M. (2008). Assessment of the hydrolysis process for the determination of okadaic acid-group toxin ester: Presence of okadaic acid 7-O-acyl-ester derivatives in Spanish shellfish. *Toxicon*, 51 (5), pp. 765–773.
- Yanagi, T., Murata, M., Torigoe, K., & Yasumoto, T. (1989). Biological Activities of Semisynthetic Analogs of Dinophysistoxin-3, the Major Diarrhetic Shellfish Toxin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53 (2), pp. 525–529.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G. K., & Clardy, J. (1985). Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, 41 (6), pp. 1019–1025.